

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Barbora Fährnichová

STANOVENÍ DERIVÁTŮ BENZOFENONU POMOCÍ UHLÍKOVÝCH PASTOVÝCH ELEKTROD

Determination of benzophenone derivates using
carbon paste electrodes

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Zima, CSc.

Praha 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 6. května 2013.

Tato práce byla řešena v souvislosti s řešením výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (projekt MSM0021620857) a byla finančně podpořena Grantovou agenturou České Republiky (projekt P206/12/G151).

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Prof. RNDr. Jiřímu Zimovi, CSc. a své konzultantce Mgr. Haně Dejmkové za odborné vedení, cenné rady i za jejich čas a trpělivost během vypracovávání mé diplomové práce. Díky patří i ostatním členům Katedry analytické chemie za jejich milý přístup a ochotu pomáhat.

Současně bych velmi ráda poděkovala svým rodičům a celé mé rodině za jejich podporu během mého studia a umožnění studia na vysoké škole.

Abstrakt

Předkládaná diplomová práce se zabývá stanovením 2,4-dihydroxybenzofenonu (BP-1) a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (BP-3) metodou HPLC s elektrochemickou a UV spektrofotometrickou detekcí. K separaci studovaných látek byla použita kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm. Jako pracovní elektrody v případě elektrochemické detekce byly použity uhlíková pastová elektroda a elektroda ze skelného uhlíku.

UV spektrofotometrická detekce probíhala při 288 nm.

Byla optimalizována metoda stanovení, kterou byly následně naměřeny kalibrační závislosti obou látek, ze kterých byly vypočítány meze detekce.

Dále byla tato metoda použita pro stanovení studovaných látek v moči, kdy bylo využito prekoncentrace BP-1 a BP-3 metodou extrakce na tuhé fázi. Kromě tohoto způsobu úpravy vzorku byla testována možnost přímého stanovení v moči s přidavkem dodecylsulfátu sodného do mobilní fáze.

Klíčová slova:

2,4-dihydroxybenzofenon

2-hydroxy-4-methoxybenzofenon

uhlíková pastová elektroda

UV spektrofotometrická detekce

HPLC s elektrochemickou detekcí

Abstract

The proposed Thesis is dealing with the determination of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1) and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3) using HPLC with electrochemical and UV spectrophotometric detection. For separation of studied substances column Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm was used. As working electrodes in case of electrochemical detection carbon paste and glassy carbon electrodes were used. UV spectrophotometric detection was running at 288 nm.

The method of determination was optimized, then used to measure calibration dependences for both substances, which were used for calculating limits of detection.

Further, this method was used for the determination of studied substances in urine where preconcentration of BP-1 and BP-3 using solid phase extraction was used. In addition to this method of sample preparation, the possibility of direct determination of the analytes in urine with the addition of sodium dodecyl sulfate to the mobile phase was tested.

Key Words:

2,4-dihydroxybenzophenone

2-hydroxy-4-methoxybenzophenone

carbon paste electrode

UV spectrophotometric detection

HPLC with electrochemical detection

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	8
1. Teoretická část.....	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Deriváty benzofenonu	11
1.3 Uhlíková pastová elektroda.....	15
2. Experimentální část.....	17
2.1 Studované látky	17
2.2 Použité chemikálie	18
2.3 Použitá aparatura.....	19
2.4 Pracovní postupy.....	20
2.4.1 Úpravy reálných vzorků.....	20
2.5 Použité vzorce	22
3. Výsledky a diskuze	23
3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobních roztoků	23
3.2 Optimalizace elektrochemické detekce.....	25
3.2.1 Optimalizace elektrochemické detekce na CPE	25
3.2.1.1 Vliv pH.....	25
3.2.1.2 Optimalizace gradientu	27
3.2.1.3 Hydrodynamické voltamogramy.....	29
3.2.1.4 Opakovatelnost měření na CPE	30
3.2.1.5 Optimalizace složení uhlíkové pasty.....	32
3.2.2 Optimalizace elektrochemické detekce na GCE	35
3.2.2.1 Hydrodynamické voltamogramy.....	35
3.2.2.2 Opakovatelnost měření na CGE.....	36
3.3 Kalibrační závislosti.....	39
3.3.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 90 μ l).....	39
3.3.2 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 μ l).....	42
3.3.3 Elektrochemická detekce na GCE.....	45
3.3.4 UV spektrofotometrická detekce	48

3.4 Stanovení studovaných látek v reálných vzorcích	51
3.4.1 Extrakce na tuhé fázi.....	51
3.4.1.1 Optimalizace extrakce na tuhé fázi	51
3.4.1.2 Kalibrační závislosti.....	53
3.4.1.2.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 μ l).....	53
3.4.1.2.2 UV spektrofotometrická detekce	57
3.4.2 Přídavek SDS do mobilní fáze	60
3.4.2.1 Kalibrační závislosti.....	60
3.4.2.1.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 μ l).....	60
3.4.2.1.2 UV spektrofotometrická detekce	64
 4. Závěr.....	67
 5. Použitá literatura.....	69

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
AU	jednotky absorbance (Absorbance Unit)
BP-1	2,4-dihydroxybenzofenon (Benzophenone-1)
BP-3	2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (Benzophenone-3)
c	koncentrace
CAS	Chemical Abstract Services
CPE	uhlíková pastová elektroda (Carbon Paste Electrode)
ED	elektrochemická detekce
E	potenciál
GC	skelný uhlík (Glassy Carbon)
h_p	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
λ	vlnová délka
L_D	mez detekce
m	hmotnost
M_r	relativní molekulová hmotnost
pK_a	záporný dekadický logaritmus disociační konstanty
R	korelační koeficient
$R_{1,2}$	rozlišení píků
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reversních fázích
SDS	dodecylsulfát sodný
SPE	extrakce na tuhé fázi (Solid Phase Extraction)
t	čas
t_R	retenční čas
UV	ultrafialová oblast

V	objem
VIS	viditelná oblast
V/V	objemový podíl
w	šířka píku při základně

1. Teoretická část

1.1 Cíl práce

Benzofenony jsou skupinou látek široce používaných k ochraně pokožky proti škodlivým vlivům UV záření jako UV filtry¹. Na druhou stranu jsou tyto sloučeniny endokrinními disruptory², což jsou látky schopné interagovat s endokrinním systémem organismu a narušit jeho hormonální rovnováhu¹, byla u nich prokázána významná estrogenní aktivita³.

Předkládaná diplomová práce se zabývá nalezením a následným využitím optimálních podmínek pro stanovení vybraných derivátů benzofenonu (2,4-dihydroxybenzofenon, 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon) pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí na uhlíkové pastové elektrodě, na GC elektrodě a UV spektrofotometrickou detekcí. Dále se zabývá dosažením co nejnižších mezí detekce analyzovaných látek a jejich stanovením v reálných vzorcích.

1.2 Deriváty benzofenonu

Sluneční záření může způsobovat spáleniny a předčasné stárnutí pokožky, podílí se na vzniku rakoviny kůže a fotodermatózy¹, na vzniku kataraktu či na aktivaci latentních virů⁴. Světová zdravotnická organizace klasifikovala již v roce 1992 UVA i UVB záření jako lidský karcinogen⁵.

Zvyšující se povědomí o rizicích spojených s vystavováním pokožky ultrafialovému záření (UV) v posledních několika desetiletích vedlo ke zvýšenému používání opalovacích prostředků obsahujících látky zmírňujících negativní dopady UV záření. Tyto látky jsou běžně označovány jako UV filtry⁶.

Účinnými látkami v opalovacích prostředcích mohou být jednak organické látky, jednak inertní anorganické minerální pigmenty jako je oxid titaničitý či oxid zinečnatý (není v EU v seznamu povolených UV filtrů, ale běžně se používá), které v zásadě působí jako fyzikální blokátory a dopadající UV záření odrážejí nebo rozptylují. Organické UV filtry jsou látky působící mechanismem absorpce, pohlcují UV záření^{5,7}. Nicméně řada těchto organických filtrů má některé nežádoucí vlastnosti, kterými je např. určitý alergenní potenciál, přes pokožku se vstřebávají do krevního oběhu a často jsou nestabilní na světle⁵.

V Evropské unii je celkem 26 různých organických sloučenin, které je povoleno používat jako ochranu proti slunečnímu záření. Benzofenony absorbují záření v rozmezí vlnových délek 200 – 400 nm, nicméně maximální absorpci vykazují v rozmezí vlnových délek 288 – 290 nm a při 325 nm. Díky tomu jsou schopny absorbovat ultrafialové záření ve formě UVA (320 – 400 nm) a UVB (290 – 320 nm), které je pro lidské tělo škodlivé⁸.

Maximální obsah těchto sloučenin v kosmetice je upravován legislativou, běžně mezi 0,1 a 10 %¹. Benzofenon a jeho deriváty jsou nejběžněji používanými UV filtry v kosmetických produktech⁹. Podle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FAD) jsou benzofenony přítomny ve více jak tisíci různých kosmetických přípravcích¹⁰. Kromě opalovacích přípravků se vyskytují také v řadě výrobků každodenního použití – v plet'ových krémech, tělových mlécích, v lacích a barvách na vlasy i v šampónech, ve rtěnkách a make-upech, lacích a odlakovačích na nehty a také v přípravcích po holení^{1,6,11}. Kromě kosmetických produktů jsou benzofenony přítomny v plastech a textiliích, v barvách do tiskáren či ve fotografických filmech, které chrání před UV zářením a zajišťují stálost jejich barev^{10,12}. Své uplatnění našly také například ve stavebním či automobilovém průmyslu, kde jsou používány jako prostředky chránící materiály proti korozi⁶.

Používání všech těchto přípravků způsobuje, že se UV filtry dostávají do povrchových vod^{2,13}, buď přímo, smýváním opalovacích přípravků z pokožky a oděvů během vodních aktivit, či nepřímo vypouštěním odpadních či bazénových vod⁶. UV filtry byly detekovány v environmentálních matricích jakými je voda, půda či usazeniny, ale i v lidských tělních tekutinách- v krvi a moči¹⁴. Zbytková množství byla nalezena i v rybách¹.

Benzofenony (BPs) jsou nejčastěji používanou skupinou UV filtrů. BPs tvoří 12 hlavních sloučenin, nazývanými Benzofenon-1 (BP-1) až Benzofenon-12 (BP-12)¹. Samotný benzofenon neboli difenylketon není vhodným absorbátorem UV záření, jeho deriváty však již ano¹⁵. BPs mají poměrně nízkou molekulovou hmotnost a obsahují dva fenolické kruhy s různým počtem hydroxylových skupin. Většina BPs je při pokojové teplotě v pevném skupenství, ve vodě jsou nerozpustné¹⁰. Vysoká lipofilita BPs jim umožňuje rychle prostoupit skrz kůži, což může způsobit jejich akumulaci v lidském těle¹². Vedle absorpce kůže mohou BPs vstupovat do lidského těla skrze potravinový řetězec¹. Pouze několik hodin po aplikaci opalovacího přípravku obsahujícího některý z BPs mohou být tyto látky přítomny v plasmě, ve žluči a v moči. Mimoto byly některé z těchto UV filtrů detekovány dokonce v mateřském mléce¹². Konkrétním příkladem může být aplikace opalovacího mléka obsahujícího BP-3: pokud je takový přípravek aplikován na kůži, 1 – 2 % z celkového aplikovaného množství se absorbuje do krevního oběhu během 10 hodin. Bylo prokázáno, že BP-3 proniká skrz lidskou kůži mnohem snadněji než jiné UV filtry. Nedávné studie využívající pokusná zvířata prokázaly, že BP-3 (2-hydroxy-4-methoxybenzofenon) je metabolizován na BP-1 (2,4-dihydroxybenzofenon) a BP-8 (2,2'-dihydroxy-4-methoxybenzofenon) – tyto deriváty jsou také používány v kosmetickém průmyslu jako UV filtry¹⁴.

Prvním BP, který byl klasifikován jako endokrinní disruptor s estrogení aktivitou byl právě BP-3^(Cit. 1). Endokrinní disruptory jsou exogenní látky nebo směsi látek, schopné měnit funkci endokrinního systému a způsobit tak nežádoucí změny ve zdravém organismu či v jeho potomstvu¹⁶. Endokrinními disruptory jsou různé chemické látky s velmi odlišnými strukturami, biochemickými vlastnostmi a různými mechanismy účinku. Jsou jimi například přírodní i syntetické hormony, přírodní součásti rostlin, pesticidy, látky používané při výrobě plastických hmot a různých konzumních výrobků, jiné průmyslově využívané látky, ale i odpady¹⁷.

Co se týče toxicity, *in vivo* a *in vitro* studie prokázaly, že BP-1 a BP-3 vykazují estrogenní a anti-androgenní aktivitu, mohou mít také vliv na reprodukci ryb. Zajímavostí je, že BP-1 vykazuje vyšší estrogenní aktivitu nežli samotný BP-3^(Cit.1). Byla též prokázána asociace mezi vystavováním se těmito látkám a vznikem endometriózy, což je gynekologické estrogen-dependentní onemocnění⁴.

V nedávné době bylo popsáno několik metod pro analýzu BPs v různých matricích, převážně ve vodách, půdách, usazeninách a v rybách, avšak pouze několik metod se zaměřilo na stanovení BPs v biologických vzorcích¹.

Mezi metodami stanovení BPs jednoznačně převládají metody chromatografické. Tyto metody nicméně vyžadují předúpravu vzorků⁸. Nejběžnějšími metodami předúpravy vzorků jsou extrakce na tuhé fázi (SPE), extrakce kapaliny kapalinou (LLE) a mikroextrakce na tuhé fázi (SPME). Navrženo bylo i několik dalších extrakčních metod, např. extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE), cloud-point extrakce (CPE, extrakce s využitím bodu zákalu) či extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (MAE). Extrakční metody jsou téměř vždy kombinovány s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), kapalinovou nebo plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (GC-MS)^{13,18}. Další vyvinutou metodou ke stanovení BPs v kosmetických přípravcích je například micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MEKC) s UV detekcí kombinovaná s cloud-point extrakcí⁴.

Přehled vybraných prací, které se zabývaly stanovením studovaných látek včetně mezi detekce v lidských tělních tekutinách je uveden v Tab. 1.1.

Tab. 1.1

Přehled vybraných prací zabývajících se stanovením BP-1 a BP-3 v biologických vzorcích.

Biologický vzorek	Analyt	Metoda stanovení	Mez detekce L_D [ng·ml ⁻¹]	Citace
moč	BP-3	SPE-LC-MS/MS	0,30	19
moč	BP-3	SPE-LC-MS/MS	0,50	20
moč	BP-3	LC-UV ($\lambda=289$ nm)	1,30	21
moč	BP-3	GC-MS	0,10	9
moč	BP-3	GC-MS	5 pg·ml ⁻¹	22
moč	BP-1, BP-3	GC-MS	0,02, 0,01	23
moč	BP-1	LC-MS/MS	0,28	3
mateřské mléko	BP-3	SPE-LC-MS/MS	0,40	24
krevní sérum	BP-3	SPE-LC-MS/MS	0,50	25
krev	BP-3	LC-UV	3,90	26

1.3 Uhlíková pastová elektroda

V roce 1958 vydal profesor R. Adams jednostránkovou publikaci, ve které světu poprvé představil uhlíkovou pastovou elektrodu (Carbon Paste Electrode, CPE)²⁷. Vynález uhlíkové pasty je úzce spojen s klasickou kapající rtuťovou elektrodou (DME) – původním úmyslem R. Adamse a jeho studentů bylo vyvinout „kapající uhlíkovou elektrodu“ (DCE), kterou by bylo možné použít jako alternativu k DME pro anodické oxidace organických sloučenin, kde DME není aplikovatelná. Experimenty s DCE nakonec vedly k objevení nového elektrodového materiálu – uhlíkové pasty s tužší konzistencí, složené ze směsi uhlíkového prášku a pojiva (pastovací kapaliny)²⁸. Od doby svého vynálezu prošly CPE velmi zajímavým vývojem a pokrokem jak v elektrochemii, elektroanalýze, tak na poli instrumentální analýzy²⁹.

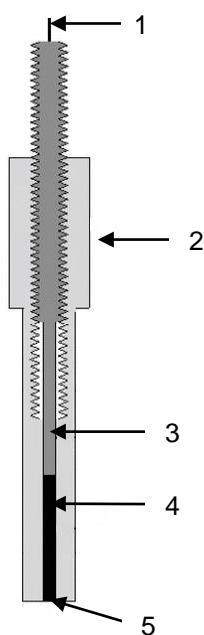
CPE jsou považovány za zvláštní typ pevných elektrod patřících do stejné skupiny jako běžné uhlíkové elektrody a elektrody z ušlechtilých kovů³⁰ a zároveň patří do zvláštní skupiny heterogenních elektrod³¹. CPE jsou tvořeny uhlíkovou pastou, což je směs tvořená uhlíkovým práškem a vhodným tekutým pojivem, kterou je plněno elektrodové tělo³¹. Vhodný uhlíkový prášek by měl splňovat několik hlavních požadavků: jednotnou velikost částic (řádově v mikrometrech), vysokou chemickou čistotu a nízkou adsorpční schopnost. Nejčastěji používanými pastovacími kapalinami jsou minerální a silikonové oleje, které jsou chemicky inertní, elektrochemicky neaktivní, málo těkavé a jsou jen minimálně rozpustné ve vodných roztocích^{28,30}. Nicméně nevýhodou past připravených z obou těchto olejů je jejich nestabilita v prostředí s vyšším obsahem organických rozpouštědel. Nejčastěji používanými materiály na výrobu elektrodových těl jsou sklo, PVC a teflon, jejichž koncový otvor o průměru 2 – 10 mm může být snadno naplněn čerstvou pastou³². Pasty připravené z parafrinového či silikonového oleje obvykle potřebují určitý čas ke stabilizaci, obvykle 12 – 24 hodin. Naplněnou elektrodu není vhodné nechávat dlouho na vzduchu, neboť pasta pozvolna vysychá, je lepší ji uchovávat ponořenou v nádobě s destilovanou vodou. Je-li elektroda správně uložena, vydrží stabilní po dobu několika měsíců^{28,30}.

Uhlíková pasta může být chemicky či biologicky modifikována a její modifikace je ve srovnání s pevnými elektrodami podstatně jednodušší³³. Modifikačním činidlem je obvykle jedna látka, nicméně složení pasty lze upravit i dvěma nebo více složkami, množství modifikátoru v pastě se obvykle pohybuje mezi 10 a 30 % (*m/m*). Hlavním důvodem modifikace elektrody je snaha o získání elektrody s novými, požadovanými a předem definovanými vlastnostmi. Modifikace může být prováděna několika alternativními způsoby,

bud' rozpuštěním modifikátoru přímo v pastovací kapalině, nebo jeho přimícháním do pasty během homogenizace³².

V současné době jsou vyvíjeny a testovány nové druhy uhlíkových past. Původní CPE jsou nahrazovány novými alternativními materiály. Klasické grafitové složky uhlíkových past jsou nahrazovány novými materiály na bázi uhlíku – fullereny “C-60“, dutými uhlíkovými vlákny či uhlíkovými nanotrubičkami. Pastovací kapaliny jsou měněny za iontové kapaliny či jiné, v nedávné době syntetizované organické kapaliny³⁴.

CPE lze využít k analýze léčiv a jejich metabolitů v biologických materiálech, zejména v moči a krvi. S CPE je možné dosáhnout velmi nízkých mezí detekce, řádově 10^{-8} – 10^{-10} mol·l⁻¹, a to jak v analýze anorganické, tak i při stanovení látek organických, léčiv a biomolekul. CPE speciálních konstrukcí mohou být využity i pro měření *in vivo* v živých tkáních pokusných zvířat, neboť živé organismy snášejí materiály na bázi uhlíkové pasty příznivě. CPE mají také malé nároky na mechanickou manipulaci a mohou být tedy využity i k analýzám v nepříznivých a náročných terénních podmínkách³⁵.



Obr. 1.1

Uhlíková pastová elektroda³⁴

1 – elektrický kontakt, 2 – teflonové tělo elektrody, 3 – píst z nerezové oceli, 4 – dutina plněná uhlíkovou pastou, 5 – koncový otvor

2. Experimentální část

2.1 Studované látky

2,4-dihydroxybenzofenon

C.A.S. číslo: 131-56-6

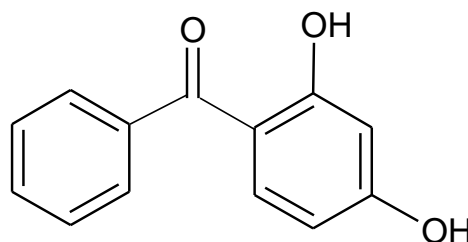
Sumární vzorec: $C_{13}H_{10}O_3$

$M_r = 214,22$

$pK_a = 7,53$

Triviální název: Benzofenon-1

zkratka: BP-1



2-hydroxy-4-methoxybenzofenon

C.A.S. číslo: 131-57-7

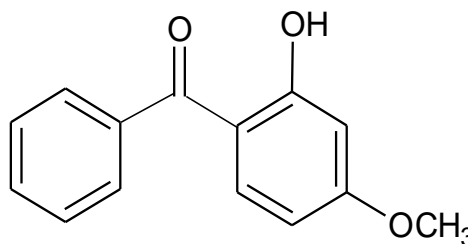
Sumární vzorec: $C_{14}H_{12}O_3$

$M_r = 228, 24$

$pK_a = 7,56$

Triviální název: Benzofenon-3

zkratka: BP-3



2.2 Použité chemikálie

Zásobní roztoky analyzovaných látek 2,4-dihydroxybenzofenonu (99%, Sigma Aldrich) a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu (98%, Sigma Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním přesně odváženého množství těchto látek v methanolu (p.a., Merck, Německo). Roztoky o nižších koncentracích byly připraveny přesným ředěním zásobních roztoků analyzovaných látek. Zásobní roztoky byly uchovávány v temnu v chladničce při konstantní teplotě 5°C .

Fosfato-acetátový pufr o příslušném pH byl připraven smísením vodného roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ s vodným roztokem obsahujícím kyselinu fosforečnou o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (85%, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika) a octovou kyselinu o koncentraci $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (99,8 %, p.a., Lach-Ner, Neratovice, Česká republika). Přesná hodnota pH pufru byla měřena pH metrem.

K přípravě mobilních fází byl použit methanol (LiChrosolv® Gradient grade, Merck, Německo). K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla použita deionizovaná voda (Millipore Q-plus System, Millipore, USA).

Uhlíková pasta byla připravena smísením 250 mg kuliček skelného uhlíku o průměru $0,4 - 12 \mu\text{m}$ (Alfa Aesar, USA) a 50, 90 nebo 120 μl minerálního oleje (Sigma) v třecí misce. Uhlíkovou pastou bylo plněno teflonové tělo pracovní elektrody o průměru 2 mm s nerezovým pístem sloužícím k vytlačení uhlíkové pasty³⁶. Čerstvě připravená uhlíková pasta byla před prvním použitím vždy minimálně 24 hodin ponechána homogenizovat.

K přípravě vodných roztoků a mobilních fází byla použita deionizovaná voda.

2.3 Použitá aparatura

Chromatografická aparatura se skládala z vysokotlaké gradientové pumpy Beta 10 (Ecom, Praha, Česká republika), dávkovače s dávkovací smyčkou o objemu 20 μl , filtru, předkolonky C18, 4 x 3 mm (Phenomenex, USA), kolony Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm (Ecom, Praha, Česká republika), degasseru DG 4014 (Ecom, Praha, Česká republika), UV/VIS spektrofotometrického detektoru Sapphire 800 (Ecom, Praha, Česká republika) a amperometrického detektoru ADLC 2 (Laboratorní přístroje, Praha, Česká republika). Amperometrický detektor byl zapojený sériově za UV detektor a pracoval v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda nebo elektroda ze skelného uhlíku (Metrohm, Švýcarsko), jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda s 3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl (ETP CZ R-008-05, Monokrystaly, Česká republika), pomocnou elektrodou byla platinová drátková elektroda. Elektrody byly zapojeny v uspořádání typu wall-jet a byly ponořeny v nádobce s mobilní fází. HPLC systém byl řízen pomocí programu Clarity 2.3. (Data Apex, Praha) pracujícího v prostředí Windows 98 (Microsoft, USA). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 1 $\text{ml}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Stálost zásobních roztoků byla proměřována na spektrofotometru Agilent 8453 (Agilent, USA) v 1mm křemenných kyvetách oproti methanolu.

Hodnoty pH byly kontrolovány na digitálním pH-metru (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (PCH 2411).

Extrakce na tuhé fázi (SPE) byla prováděna na extrakčních kolonkách LiChrolut® EN 200 mg/ 3 ml (Merck, Německo) obsahujících kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu.

Všechna měření probíhala za laboratorní teploty.

2.4 Pracovní postupy

Mobilní fáze byly připraveny smísením příslušných objemových dílů methanolu a vodné složky. Jejich pH bylo upravováno změnou pH vodné složky mobilní fáze, tedy fosfáto-acetátového pufru. V práci uvedené hodnoty pH mobilních fází se vždy vztahují k hodnotě pH vodné složky.

Během optimalizace měření byl používán roztok směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky.

Kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Hodnoty výšek píků byly brány jako průměrná hodnota ze třech následujících měření. Meze detekce (L_D) byly určeny jako množství analytu poskytující signál odpovídající trojnásobku absolutní hodnoty šumu základní linie.

2.4.1 Úpravy reálných vzorků

Stanovení BP-1 a BP-3 v reálném vzorku moči probíhalo metodou HPLCE-ED na uhlíkové pastové elektrodě při potenciálu +1,1 V. Dávkovaný objem byl 20 μl .

První metodou úpravy vzorků pro stanovení studovaných látek v reálném vzorku moči bylo zakoncentrování vzorku moči metodou extrakce na tuhé fázi (SPE).

Extrakce studovaných látek z moči byla provedena metodou extrakce na tuhé fázi na extrakčních kolonkách LiChrolut® EN 200 mg/ 3 ml (Merck, Německo) obsahujících jako sorbent kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Aktivace extrakčních kolonek byla provedena dle doporučení výrobce³⁷ následovně: sorbent byl postupně promyt 3 ml methanolu a následně 3 ml deionizované vody samospádem, bez použití podtlaku.

Vzorky pro stanovení studovaných látek v moči byly připraveny následovně: do 100ml odměrné baňky bylo odpipetováno přesně vypočtené množství zásobních roztoků BP-1 a BP-3 a doplněno do 100 ml zfiltrovanou močí upravenou na pH 4 pomocí koncentrované HCl. Vzorky byly pomocí podtlaku prosáty skrze sorbent rychlostí cca $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Následně byl sorbent promyt 1 ml deionizované vody a 5 minut byl vzduchem sušen. Adsorbované studované látky byly ze sorbetu vymyty 4 ml acetonu bez použití podtlaku. 20 μl takto upraveného vzorku bylo dávkováno do chromatografického systému.

Vzorky moči byly v den analýzy odebírány čerstvé, jejich pH bylo vždy upraveno pomocí koncentrované HCl na hodnotu 4. Následně byla moč zfiltrována přes filtrační papír.

Druhým způsobem práce s reálnými vzorky moči bylo přidání SDS do mobilní fáze. Tato mobilní fáze obsahovala při stanovení studovaných látek v moči navíc $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ dodecylsulfát sodný, určený k zamaskování bílkovin či jiných složek přítomných v moči^{38,39}. Přesně odvážené množství SDS bylo rozpuštěno v methanolu, který byl použit jako mobilní fáze. Vzorky pro stanovení BP-1 a BP-3 v moči byly připraveny následovně: do 10 ml odměrné baňky bylo odpipetováno přesně vypočtené množství zásobních roztoků BP-1 a BP-3 a doplněno do 10 ml zfiltrovanou močí upravenou na pH 4 pomocí koncentrované HCl. Vzorky moči byly do chromatografického systému dávkovány zfiltrované přes filtrační papír, bez předchozí extrakce.

Vzorky moči byly v den analýzy odebírány čerstvé.

2.5 Použité vzorce

Rozlišení píků:

$$R_{1,2} = \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{0,5 \cdot (w_1 + w_2)}$$

$R_{1,2}$ rozlišení píků

$t_{R,1}, t_{R,2}$ retenční časy

w_1, w_2 šířka píku při základně

3. Výsledky a diskuze

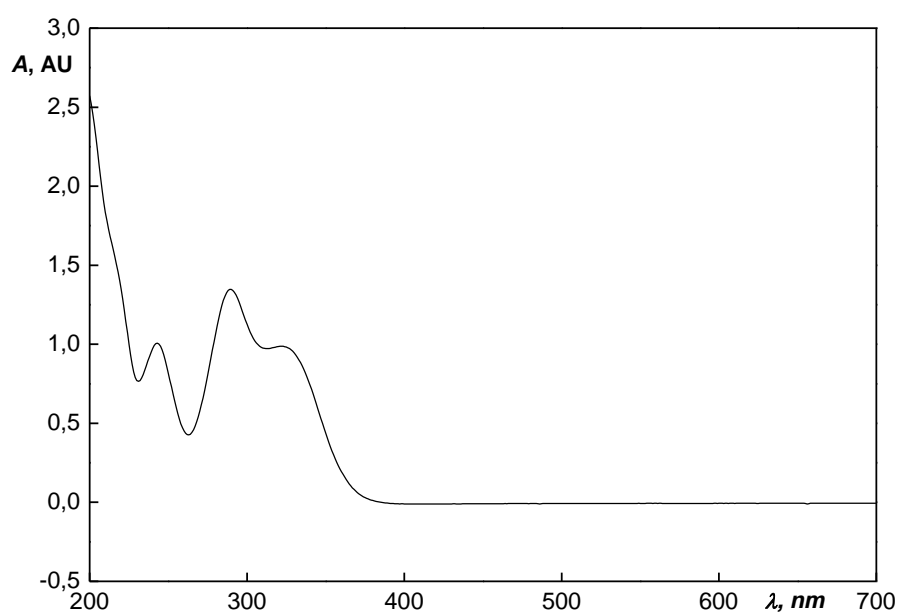
3.1 Spektrofotometrické studium stálosti zásobních roztoků BP-1 a BP-3

Stálost zásobních roztoků BP-1 a BP-3 o koncentracích $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla po dobu 310 dní průběžně sledována spektrofotometricky. Absorpční spektra byla měřena v 1 mm křemenných kyvetách proti methanolu v rozmezí vlnových délek 200 – 700 nm. Získaná spektra jsou uvedena na Obr. 3.1. a na Obr. 3.2. Vzhledem k podobné struktuře obou látek jsou si spektra velmi podobná, absorpční maximum BP-1 je 289 nm a absorpční maximum BP-3 je 287 nm. Naměřené hodnoty absorbancí při vlnové délce absorpčního maxima jednotlivých látek jsou uvedeny v Tab. 3.1. Z naměřených hodnot je patrné, že zásobní roztoky obou látek jsou při uchování v temnu v chladničce (5 °C) stále nejméně 300 dní.

Tab. 3.1

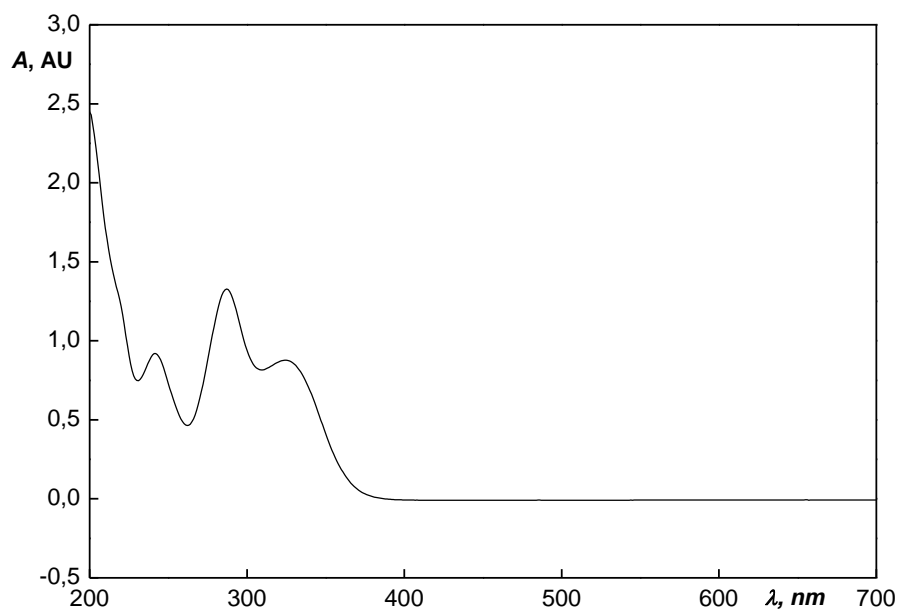
Stálost zásobních roztoků BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu.

t [dny]	BP-1		BP-3	
	$\lambda = 289 \text{ nm}$		$\lambda = 287 \text{ nm}$	
	A	%	A	%
1	1,370	100	1,328	100
4	1,362	99,4	1,315	99,0
8	1,347	98,3	1,326	99,8
14	1,384	101,0	1,339	100,8
50	1,336	97,5	1,304	98,2
217	1,397	101,9	1,363	102,6
318	1,361	99,3	1,322	99,5



Obr. 3.1

UV-VIS spektrum $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ BP-1 v methanolu (měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti methanolu).



Obr. 3.2

UV-VIS spektrum $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ BP-3 v methanolu (měřeno v 1mm křemenné kyvetě proti methanolu).

3.2 Optimalizace elektrochemické detekce

3.2.1 Optimalizace elektrochemické detekce na CPE

Pro docílení co nejlepší separace a detekce dělených analytů bylo nezbytné určit vhodné separační a detekční podmínky. Sledovanými parametry byly hodnota pH mobilní fáze, gradient mobilní fáze a potenciál vkládaný na pracovní elektrodu.

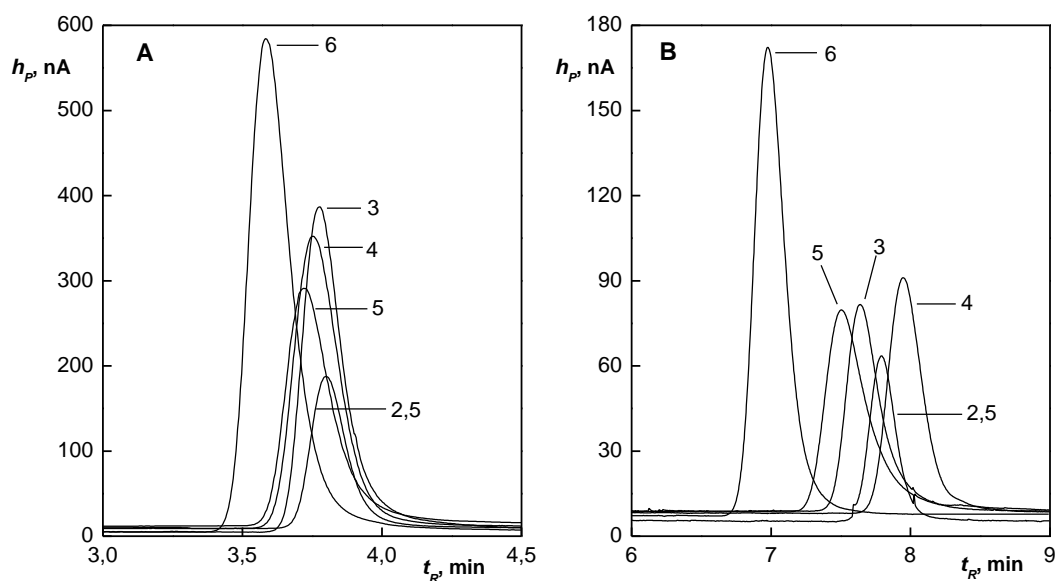
3.2.1.1 Vliv pH

Při optimalizaci separace BP-1 a BP-3 bylo prvním krokem prozkoumání vlivu pH mobilní fáze na retenci analytů. Proměřovaný rozsah hodnot pH byl volen s ohledem na pracovní rozsah kolony, měření probíhala v mobilní fázi složené z methanolu a fosfato-acetátového pufru o pH 2,5, 3, 4, 5 a 6 v poměru 70:30 (V/V). Při každé hodnotě pH mobilní fáze byly naměřeny chromatogramy analyzovaných látek. K elektrochemické detekci byla použita CPE připravená z 90 μ l minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček.

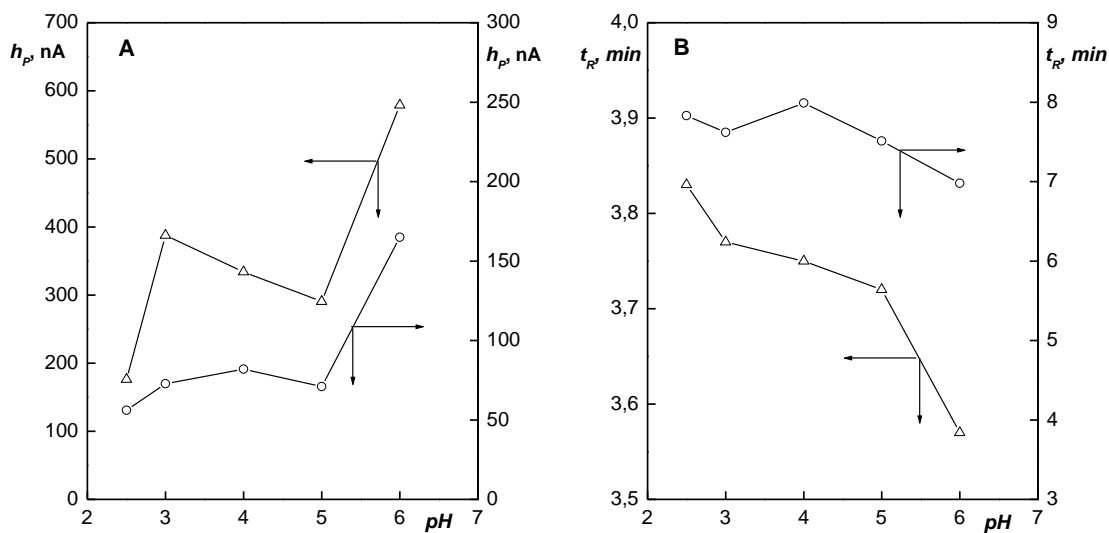
Po každé změně hodnoty pH mobilní fáze byl obnovován povrch elektrody otřením do navlhčeného filtračního papíru. Potenciál vložený na pracovní elektrodu byl +1,0 V.

Z naměřených chromatogramů (Obr. 3.3) vyplývá, že s měnící se hodnotou pH se mění retenční časy a výšky píků obou látek, tyto závislosti jsou znázorněny na Obr. 3.4.

Při všech hodnotách pH mobilní fáze bylo dosaženo úplné separace obou složek směsi. Jako optimální pH mobilní fáze pro další měření bylo po vyhodnocení naměřených chromatogramů zvoleno pH 6, při kterém eluovaly obě látky s nejkratším retenčním časem a zároveň při tomto pH byly píky obou látek nejvyšší; měřením hydrodynamických voltamogramů bylo později ověřeno, že závislost výšky píků na pH si zachovává stejný trend i při detekčním potenciálu optimálním pro jednotlivá pH mobilní fáze (viz kapitola 3.2.1.3).

**Obr. 3.3**

Chromatogramy BP-1 (A) a BP-3 (B) v závislosti na pH mobilní fáze. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,0 V v prostředí methanolu a fosfato-acetátového pufru o pH odpovídajícím označení dané křivky v poměru 70:30 (V/V). Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l $^{-1}$ každé složky, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml·min $^{-1}$.

**Obr. 3.4**

Závislost výšky píků (A) a retenčních časů (B) BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) na hodnotě pH mobilní fáze. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,0 V v prostředí methanolu a fosfato-acetátového pufru o pH 2,5, 3, 4, 5 a 6 v poměru 70:30 (V/V). Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol·l $^{-1}$ každé složky, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml·min $^{-1}$.

3.2.1.2 Optimalizace gradientu

Izokratickou elucí bylo možné dosáhnout separace analytů, ale jejich rozlišení bylo zbytečně velké. Cílem optimalizace bylo zvolit takové podmínky, při kterých by bylo dosaženo co nejnižších retenčních časů analyzovaných látek a zároveň docíleno oddělení obou analytů nejen vzájemně, ale i od systémového píku, jehož přítomnost je nutné vždy u analýz reálných vzorků předpokládat. Nejvhodnějším prostředkem k tomuto cíli může být použití gradientové eluce, proto byla dalším krokem optimalizace separace volba vhodného gradientu.

Měření probíhala při zvolené optimální hodnotě pH mobilní fáze, tj. při pH 6. K elektrochemické detekci byla použita CPE připravená z 90 μ l minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček, potenciál vložený na pracovní elektrodu byl +1,0 V.

V Tab. 3.2 jsou popsány studované gradienty. Při každém gradientu byly naměřeny chromatogramy směsi BP-1 a BP-3. V Tab. 3.3 jsou uvedeny základní charakteristiky chromatogramů získané měřením směsi látek za různých gradientů. Vybrané chromatogramy naměřené při jednotlivých gradientech jsou uvedeny na Obr. 3.5.

Jako optimální gradient pro další měření byl vybrán gradient D, při kterém během separace došlo k dostatečnému oddělení obou látek ve směsi a zároveň obě látky eluovaly s nejkratším časem, čímž bylo dosaženo snížení celkové doby analýzy.

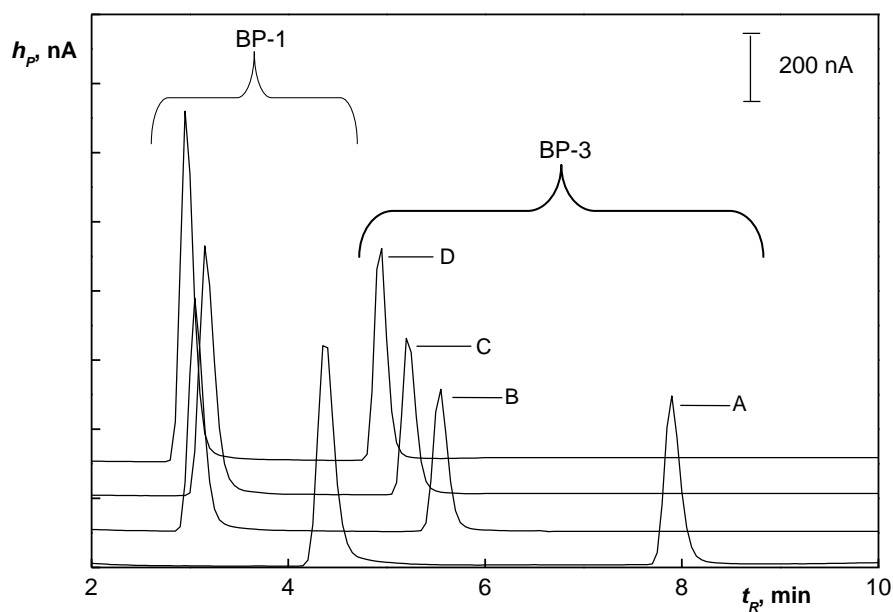
Tab. 3.2
Přehled studovaných gradientů mobilní fáze.

Gradient	Počáteční stav	Konečný stav	
	Poměr methanol : pufr	Čas [min]	Poměr methanol : pufr
A	60 : 40	10	90 : 10
B	70 : 30	8	90 : 10
C	70 : 30	6	90 : 10
D	70 : 30	5	91 : 09

Tab. 3.3

Základní charakteristiky chromatogramů směsi BP-1 a BP-3 naměřené izokraticky a při různých gradientech (A-D).

Gradient	h_P [nA]		$w_{1/2}$ [min]		t_R , BP-3 [min]	$R_{1,2}$
	BP-1	BP-3	BP-1	BP-3		
A	713	515	0,17	0,17	7,91	12,33
B	700	446	0,15	0,15	5,56	9,69
C	763	514	0,16	0,13	5,24	8,34
D	1099	719	0,14	0,12	4,95	8,86
izokraticky	579	165	0,17	0,25	6,98	16,18

**Obr. 3.5**

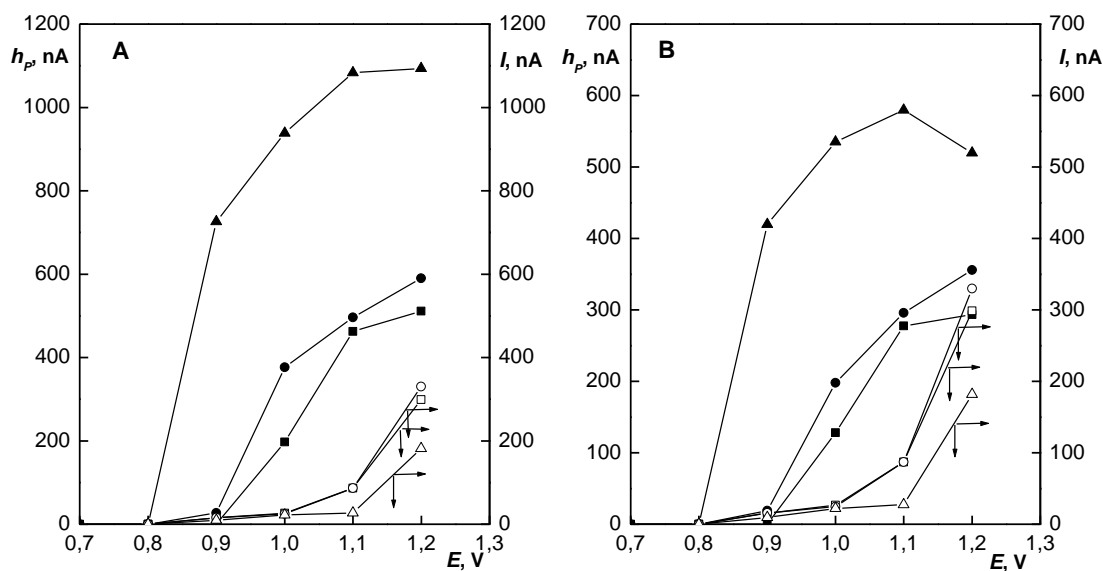
Chromatogramy směsi BP-1 a BP-3 naměřené při různých gradientech (A-D). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,0 V v prostředí methanolu a fosfáto-acetátového pufru o pH 6 v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ každé složky. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml \cdot min $^{-1}$.

3.2.1.3 Hydrodynamické voltamogramy

K určení optimálního potenciálu vkládaného na pracovní elektrody byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy, tj. závislost výšky píku na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu.

Měření hydrodynamických voltamogramů probíhala v mobilní fázi o pH 2,5, 4 a 6 a při použití gradientu D. K detekci byla použita CPE připravená z 90 μl minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček. Po každé změně hodnoty pH mobilní fáze byl obnovován povrch elektrody. Proměřovaný rozsah potenciálů byl +0,7 až +1,2 V s postupným zvyšováním po 0,1 V.

Hydrodynamické voltamogramy získané vyhodnocením z výšek píků jednotlivých látek při různých hodnotách pH jsou znázorněny na Obr. 3.6 A pro BP-1 a 3.6 B pro BP-3. Současně byla sledována velikost hodnoty proudu pozadí, aby bylo ověřeno, že měření probíhají v oblasti před zvýšením proudu pozadí. Jako optimální pH bylo zvoleno pH 6 a jako vhodný potenciál byl zvolen potenciál +1,1 V, při kterém byly píky obou látek nejvyšší, a zároveň nedošlo k významnému zvýšení hodnoty signálu pozadí.



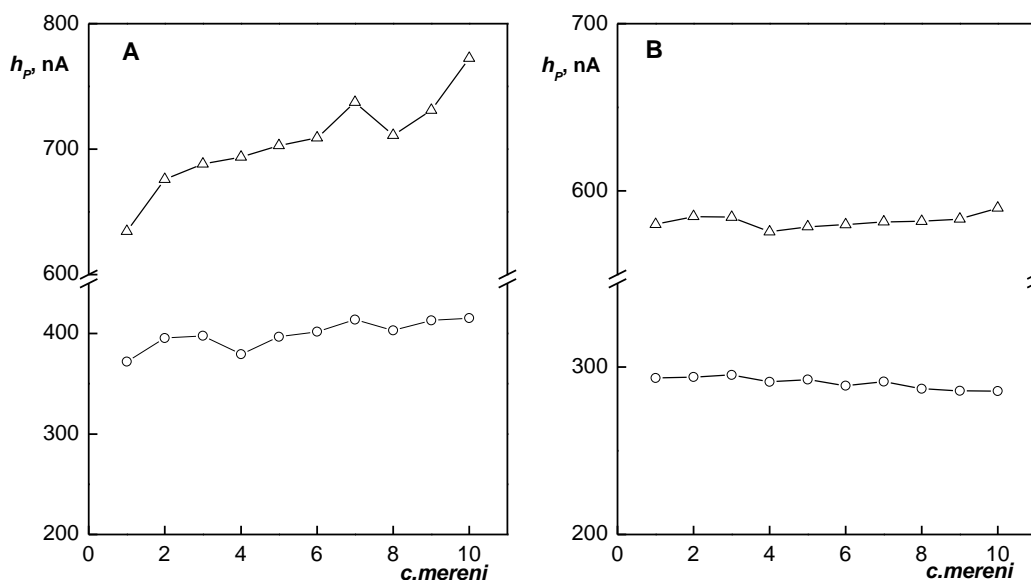
Obr. 3.6

Hydrodynamické voltamogramy BP-1 (A) a BP-3 (B) při pH 2,5(■), 4(●) a 6(▲), proud pozadí při pH 2,5(□), 4(○) a 6(Δ). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μl). Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky, gradient D, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.1.4 Opakovatelnost měření na CPE

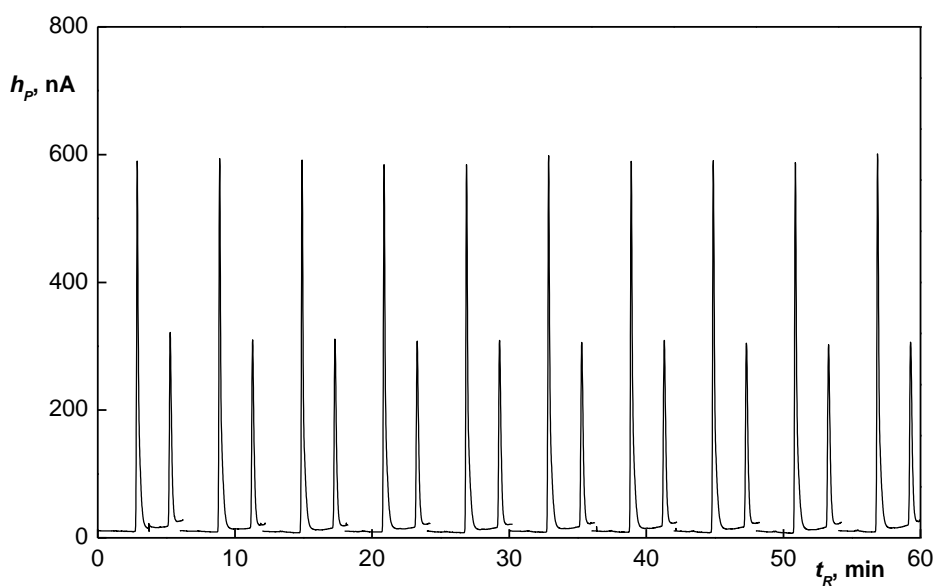
Za nalezených optimálních podmínek stanovení, tedy při gradientu D, pH mobilní fáze o pH 6 a detekčním potenciálu +1,1 V, byla studována opakovatelnost měření na CPE složené z 90 μl minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček. Bylo provedeno deset po sobě jdoucích měření bez otírání povrchu elektrody mezi jednotlivými měřeními.

Na Obr. 3.7 je znázorněna závislost výšky píku (h_p) BP-1 a BP-3 na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody. Z naměřených hodnot (Obr. 3.7A) bylo zjištěno, že při gradientu D dochází k postupnému zvyšování signálu, což by mohlo být způsobeno vysokým procentem obsahu methanolu, kdy dochází k postupnému vymývání pastovací kapaliny a zvětšuje se plocha elektroaktivního povrchu. Pro ověření této možnosti byl zaveden gradient E, spočívající v nárůstu methanolu ze 70 % na 85 % methanolu za 5 minut. Z hodnot naměřených za těchto podmínek (Obr. 3.7B) plyne, že opakovatelnost měření na CPE připravené z 90 μl minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček při sníženém obsahu methanolu, tj. 85% methanolu v 5 minutách, je dostačující. Výsledný chromatogram deseti po sobě jdoucích měření při gradientu E bez otírání povrchu elektrody během měření je znázorněn na Obr. 3.8.



Obr. 3.7

Opakovatelnost měření na CPE, závislost výšky píku (h_p) BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody při gradientu D (obr. A) a gradientu E (obr. B). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μl) při potenciálu +1,1 V v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky směsi. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.



Obr. 3.8

Chromatogramy deseti po sobě jdoucích měření směsi BP-1 a BP-3 bez otírání povrchu elektrody při gradientu E. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,1 V v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ každé složky směsi. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml \cdot min $^{-1}$.

3.2.1.5 Optimalizace složení uhlíkové pasty

Data získaná během studia opakovatelností ukázala, že možnost použití uhlíkové pasty v prostředí vyžadovaném optimálním gradientem je omezená. Naskytá se tedy otázka, zda lze stabilitu pasty ovlivnit volbou jejího složení, v první řadě poměrem uhlíkového materiálu a pastovací kapaliny.

Proto bylo připraveno několik past s různým podílem pastovací kapaliny, konkrétně bylo s 250 mg uhlíkových kuliček smícháno 50, 90, 120 μ l minerálního oleje. U jednotlivých past byla studována opakovatelnost měření nejprve při gradientu E a následně i při gradientu D. Změny výšek prvního a desátého naměřeného píku získané měřeními na pastách různého složení a při použití gradientů E a D jsou uvedeny v Tab. 3.4.

Na Obr. 3.9 je znázorněna závislost výšky píku (h_p) BP-1 a BP-3 na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody naměřená na pastě složené z 250 mg uhlíkových kuliček a 50 μ l minerálního oleje. Z naměřených hodnot vyplývá, že pasta tohoto složení není stabilní a nelze ji tedy použít ani pro měření při gradientu E, tedy při obsahu methanolu 85 %. Opakovatelnost měření na této pastě při gradientu D nebyla studována. Na Obr. 3.10 je znázorněna závislost výšky píku (h_p) BP-1 a BP-3 na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody naměřená na pastě složené z 250 mg uhlíkových kuliček a 120 μ l minerálního oleje při gradientu E (Obr. 3.10A) a při gradientu D (Obr. 3.10B). Z naměřených hodnot vyplývá, že pasta řidšího složení je stabilní i při gradientu D a byla tedy použita pro měření kalibračních závislostí při tomto gradientu.

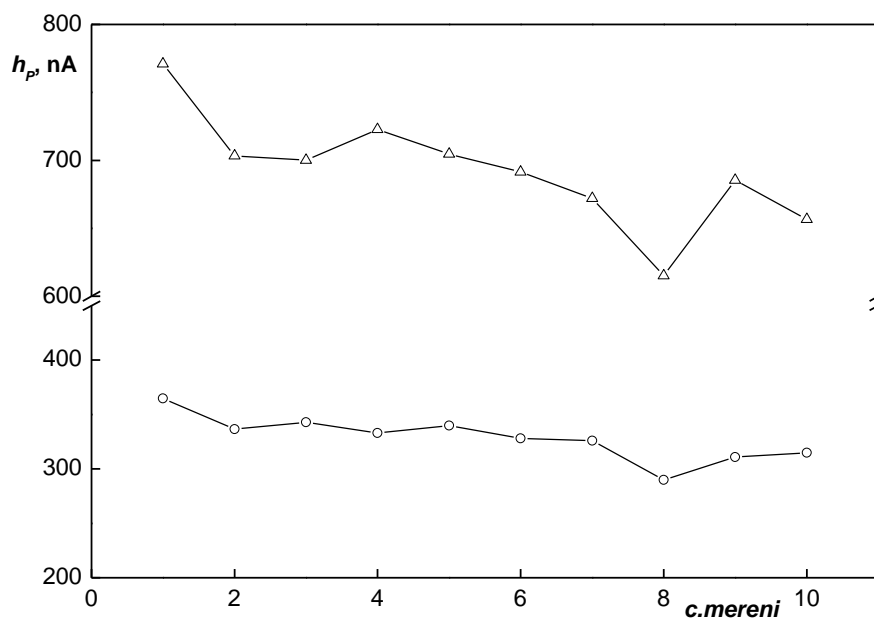
Pro určení optimálního potenciálu vloženého na pracovní elektrodu byly dále, proměřeny hydrodynamické voltamogramy.

Hydrodynamické voltamogramy, získané vyhodnocením z výšek píků jednotlivých látek při různém složení uhlíkové pasty pracovní elektrody, jsou znázorněny na Obr. 3.11. Současně byla sledována velikost hodnoty proudu pozadí. Je zřejmé, že hodnota proudu pozadí se s rostoucím potenciálem zvyšuje. Jako optimální potenciál vložený na pracovní elektrodu tvořenou pastou 3 byl zvolen potenciál +1,1 V, při kterém byly píky obou látek nejvyšší, a zároveň nedošlo k významnému zvýšení hodnoty signálu pozadí.

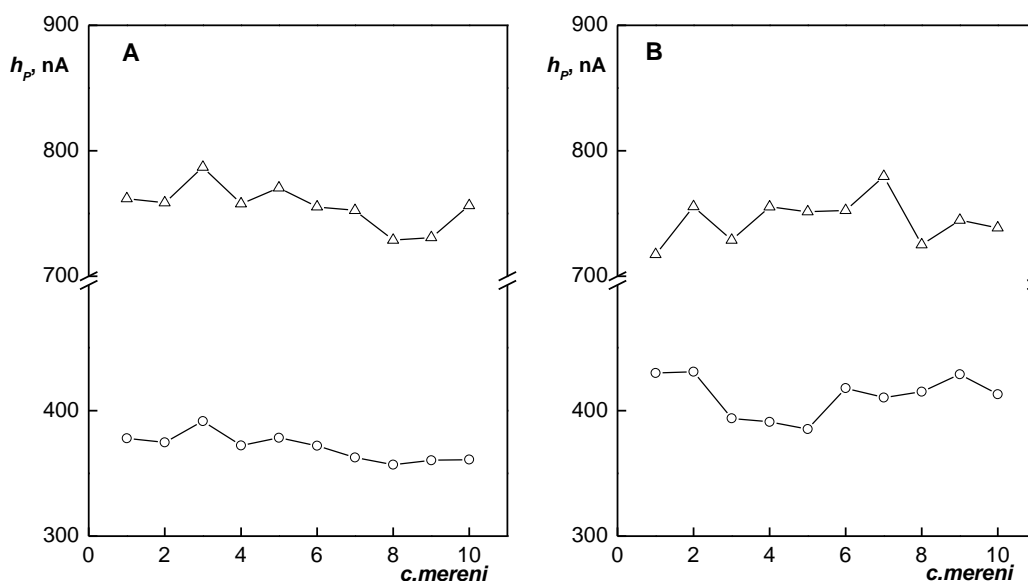
Tab. 3.4

Změny výšek prvního a desátého naměřeného píku získané měřeními na pastách různého složení při použití gradientů E a D.

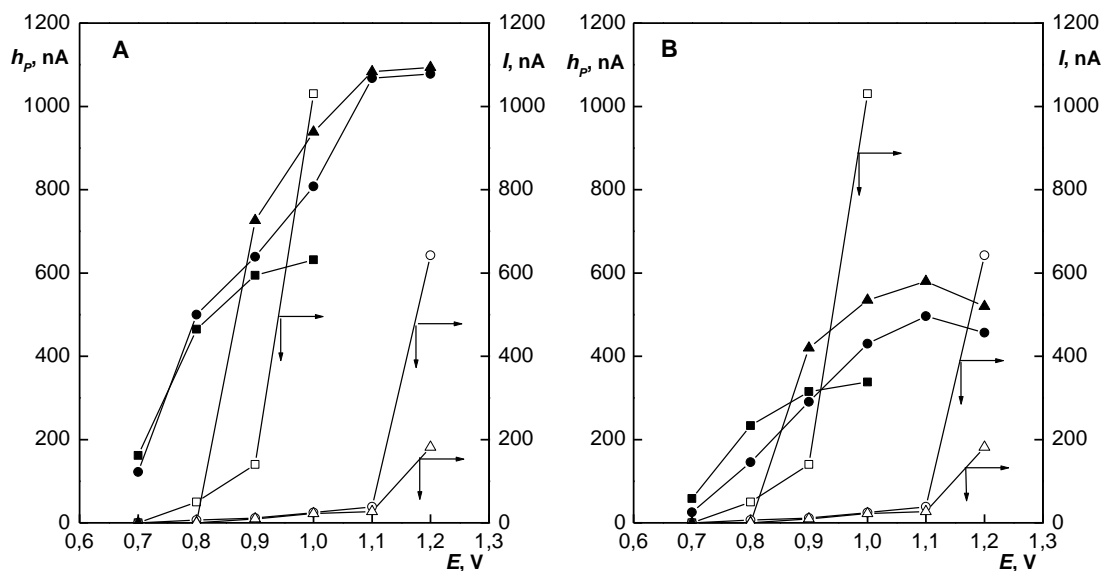
Složení pasty	250 mg uhlíku : 50 µl oleje		250 mg uhlíku : 90 µl oleje		250 mg uhlíku : 120 µl oleje	
Gradient	Změna výšky píku (%)					
	BP-1	BP-3	BP-1	BP-3	BP-1	BP-3
	D	—	—	21,7	11,6	2,9
E	-14,8	-13,7	1,7	-2,7	-4,7	-4,4

**Obr. 3.9**

Opakovatelnost měření na CPE (250 mg : 50 μ l), závislost výšky píku (h_p) BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody při gradientu E. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,0 V v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.10**

Opakovatelnost měření na CPE (250 mg : 120 μ l), závislost výšky píku (h_p) BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) na počtu opakovaných měření bez otírání povrchu elektrody při gradientu E (A) a D (B). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při potenciálu +1,0 V v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ každé složky. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml \cdot min $^{-1}$.

**Obr. 3.11**

Hydrodynamické voltamogramy BP-1 (A) a BP-3 (B) naměřené na CPE různého složení: 250 mg : 90 μ l (\blacktriangle), : 50 μ l (\blacksquare), : 120 μ l (\bullet) a proud pozadí 250 mg : 90 μ l (Δ), : 50 μ l (\square) a : 120 μ l (\circ). Měřeno metodou HPLC-ED na CPE při různých potenciálech v roztoku směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol \cdot l $^{-1}$ každé složky směsi. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient E, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml \cdot min $^{-1}$.

3.2.2 Optimalizace elektrochemické detekce na GCE

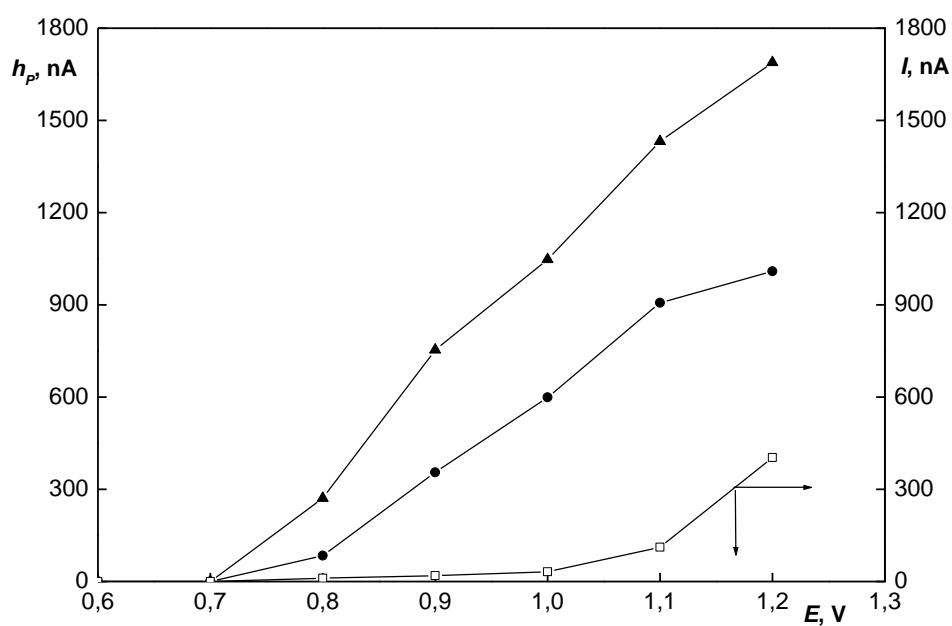
V další části práce byla k elektrochemické detekci použita elektroda ze skelného uhlíku, kterou bylo možné použít i pro měření za nalezeného optimálního gradientu, aniž by se elektroda poškozovala.

3.2.2.1 Hydrodynamické voltamogramy

K určení optimálního potenciálu vkládaného na pracovní GC elektrodu byly proměřeny hydrodynamické voltamogramy, tj. závislosti výšky píku na potenciálu vloženém na pracovní elektrodu.

Měření hydrodynamických voltamogramů probíhala v mobilní fázi o pH 6 a při použití gradientu D. K detekci byla použita GC elektroda. Proměřovaný rozsah potenciálů byl +0,7 V až +1,2 V s postupným zvyšováním po 0,1 V.

Hydrodynamické voltamogramy získané vyhodnocením z výšek píků jednotlivých látek při různých potenciálech vložených na pracovní elektrodu jsou znázorněny na Obr. 3. 16. Současně byla sledována velikost hodnoty proudu pozadí. Je zřejmé, že hodnota proudu pozadí se s rostoucím potenciálem zvyšuje. Jako optimální potenciál byl zvolen potenciál +1,1 V, při kterém byly píky obou látek nejvyšší, a zároveň nedošlo k významnému zvýšení hodnoty signálu pozadí.



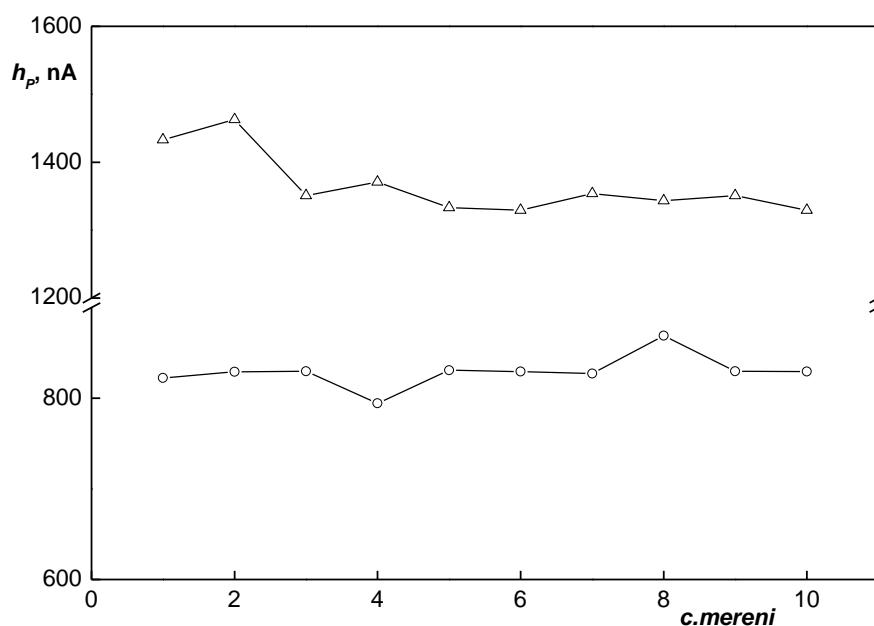
Obr. 3.12

Hydrodynamické voltamogramy BP-1 (\blacktriangle) a BP-3 (\bullet) při pH 6, proud pozadí při pH 6 (\square). Měřeno metodou HPLC-ED na GCE. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.2.2.2 Opakovatelnost měření na GCE

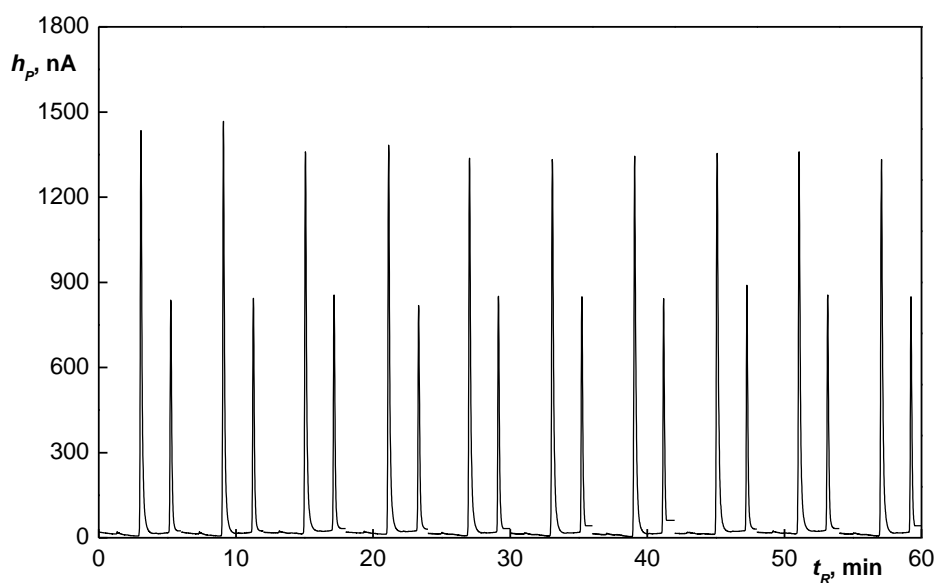
Za nalezených optimálních podmínek stanovení, tedy při gradientu D, mobilní fáze o pH 6 a detekčním potenciálu +1,1 V, byla studována opakovatelnost měření na GC elektrodě. Bylo provedeno deset po sobě jdoucích měření bez čištění povrchu elektrody mezi jednotlivými měřeními.

Na Obr. 3.13 je znázorněna závislost výšky píku (h_p) BP-1 a BP-3 na počtu opakovaných měření bez čištění povrchu elektrody. Z naměřených hodnot plyne, že opakovatelnost měření na GC elektrodě je za těchto podmínek dostačující. Výsledný chromatogram deseti po sobě jdoucích nástríků bez čištění povrchu elektrody mezi jednotlivými měřeními je znázorněn na Obr. 3. 14.



Obr. 3.13

Opakovatelnost měření na GCE, závislost výšky píku (h_p) BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) na počtu opakovaných měření bez čištění povrchu elektrody při gradientu D. Měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.14**

Chromatogramy deseti po sobě jdoucích měření směsi BP-1 a BP-3 bez čištění povrchu elektrody při gradientu D. Měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi BP-1 a BP-3 o koncentraci $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ každé složky, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.3 Kalibrační závislosti

Kalibrační závislosti byly měřené metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na stabilních elektrodách, tedy na CPE (250 mg : 120 μ l) a na GCE, při optimálním gradientu D, a na běžně používané pastě, tj. na CPE (250 mg : 90 μ l), při gradientu E. Pro porovnání byla vedle elektrochemické detekce použita UV spektrofotometrická detekce při vlnové délce 288 nm. Za nalezených optimálních podmínek byly zjištěny meze detekce L_D pro BP-1 a BP-3.

3.3.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 90 μ l)

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití elektrochemické detekce na CPE složené z 250 mg uhlíkových kuliček a 90 μ l minerálního oleje byly naměřeny v rozsahu koncentrací $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3 za nalezených optimálních podmínek, tedy při pH 6 mobilní fáze, gradientu E a detekčním potenciálu +1,1 V.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, včetně vypočtené meze detekce L_D jsou uvedeny v Tab. 3.5 pro BP-1 a v Tab. 3.6 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9986 až 0,9997 pro BP-1 a v rozmezí 0,9958 až 0,9969 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.12. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrační řád pro obě látky je znázorněna na Obr. 3.13.

Mez detekce BP-1 byla $1,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $3,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3.

Tab. 3.5

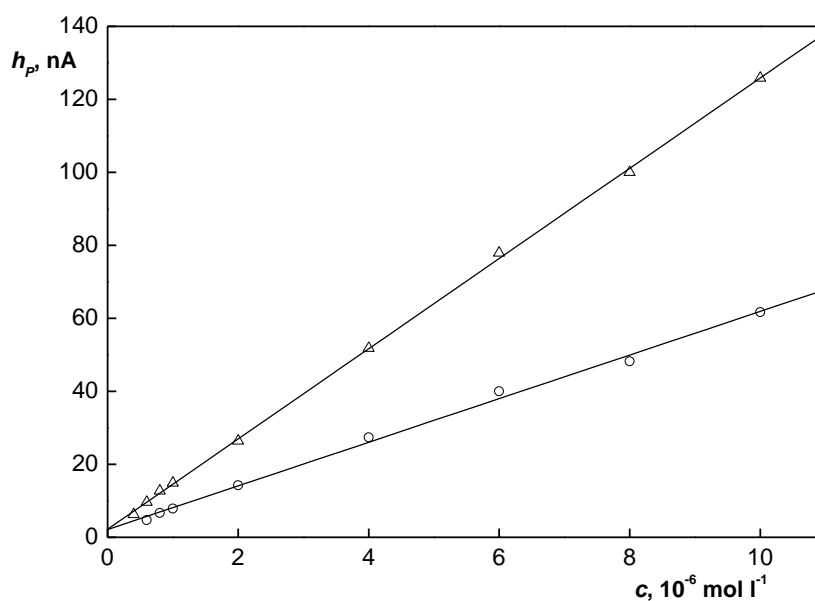
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient E, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{nA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	92,5	43,3	0,9991	—
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	123,6	2,2	0,9997	$1,6 \cdot 10^{-7}$
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	96,5	14,7	0,9986	—

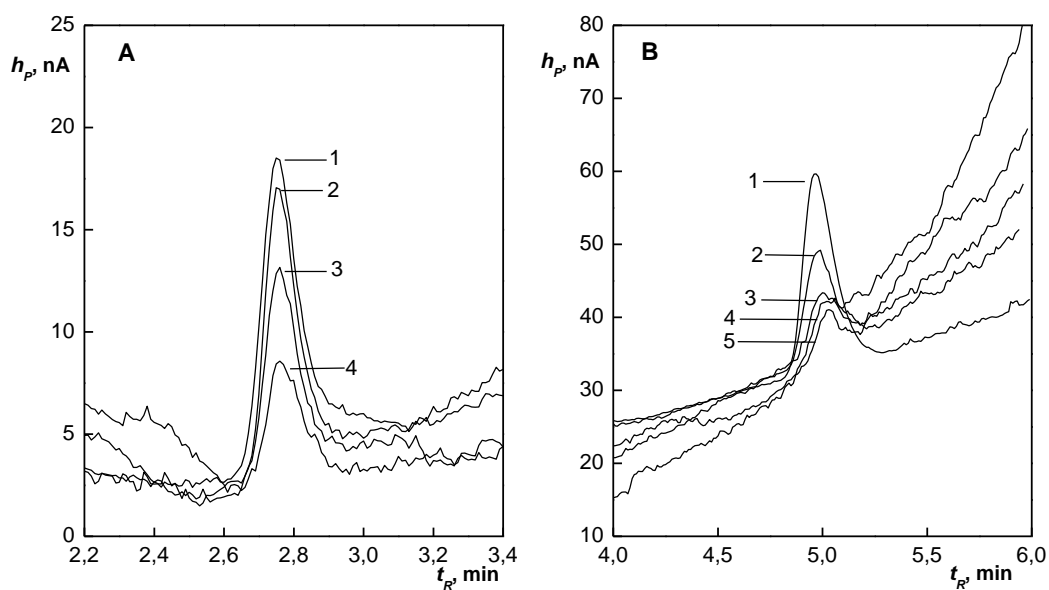
Tab. 3.6

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient E, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

c mol·l ⁻¹	směrnice nA·mol ⁻¹ ·l	úsek nA	R^2	L_D mol·l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	39,4	34,7	0,9961	—
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	59,8	2,1	0,9969	$3,3 \cdot 10^{-7}$
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	42,6	11,6	0,9958	—

**Obr. 3.12**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (○) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ pro BP-1 a $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ pro BP-3, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μ l) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient E, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

**Obr. 3.13**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) o koncentracích $10 \cdot 10^{-7}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a chromatogramů BP-3 (B) o koncentracích $40 \cdot 10^{-7}$ (1), $20 \cdot 10^{-7}$ (2), $10 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $6 \cdot 10^{-7}$ (5), měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient E, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.3.2 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 µl)

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití elektrochemické detekce na CPE složené z 250 mg uhlíkových kuliček 120 µl minerálního oleje byly naměřeny v rozsahu koncentrací $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$ za nalezených optimálních podmínek, tedy mobilní fázi o pH 6, gradientu D a detekčním potenciálu +1,1 V.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, včetně vypočtené meze detekce L_D jsou uvedeny v Tab. 3.7 pro BP-1 a v Tab. 3.8 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9963 až 0,9988 pro BP-1 a v rozmezí 0,9987 až 0,9992 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.14. Série chromatogramů nejnižších koncentrací pro obě látky je znázorněna na Obr. 3.15.

Mez detekce BP-1 byla $1,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3.

Hodnoty mezí detekce získané při použití elektrochemické detekce na CPE (250 mg : 90 µl) (viz. kapitola 3.2.2.1) a na CPE (250 mg : 120 µl) jsou srovnatelné a je tedy zřejmé, že složení uhlíkové pasty nemá významný vliv na snížení meze detekce.

Tab. 3.7

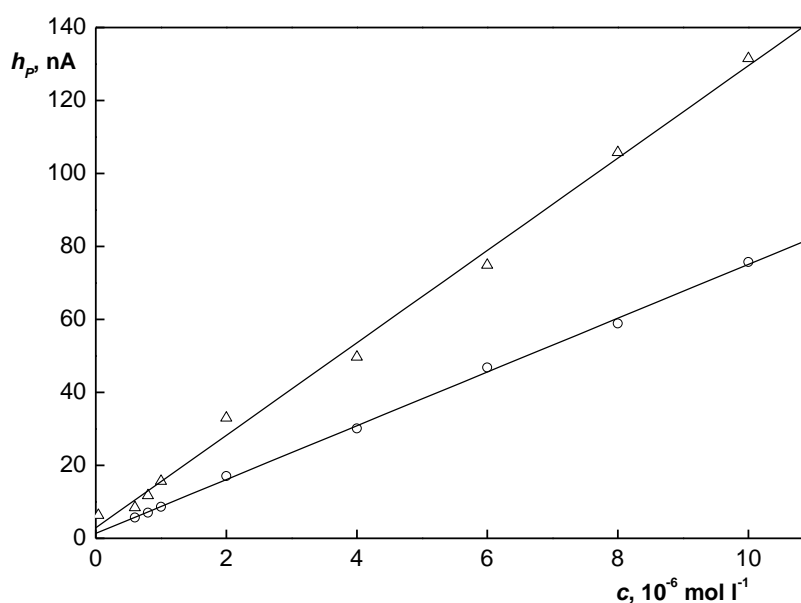
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 µl) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 µm, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 µl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{nA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	91,4	26,6	0,9988	—
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	128,2	1,8	0,9963	$1,4 \cdot 10^{-7}$
$4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	93,1	15,2	0,9985	—

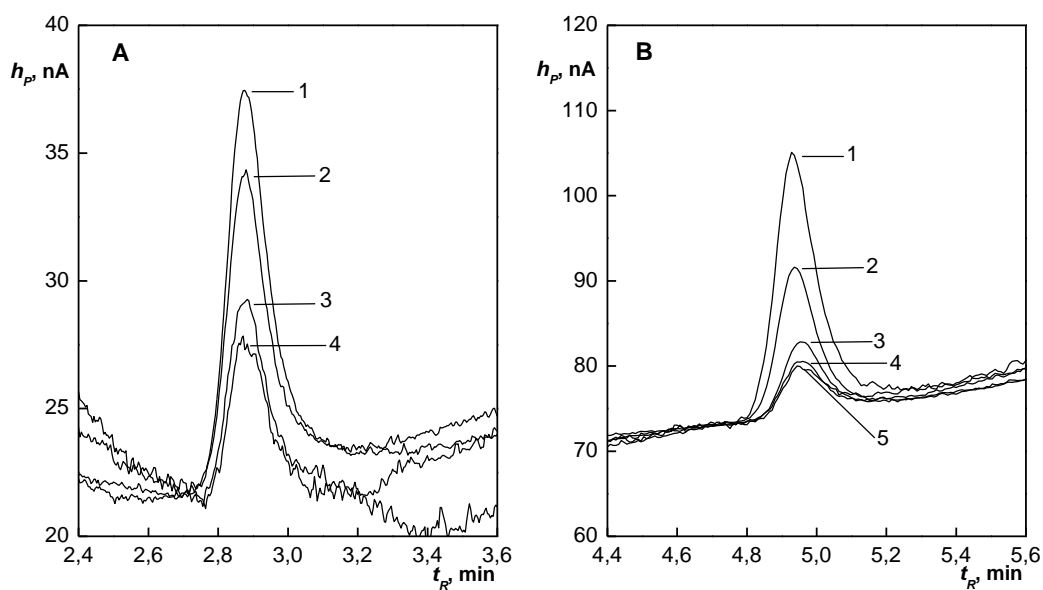
Tab. 3.8

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

c mol·l ⁻¹	směrnice nA·mol ⁻¹ ·l	úsek nA	R^2	L_D mol·l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	52,2	16,2	0,9992	—
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	73,7	1,4	0,9989	$2,2 \cdot 10^{-7}$
$6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	53,1	10,1	0,9987	—

**Obr. 3.14**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (○) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ pro BP-1 a $6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ BP-3. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

**Obr. 3.15**

Výřezy chromatogramů BP-1 (A) o koncentracích $10 \cdot 10^{-7}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4) mol·l⁻¹ a chromatogramů BP-3 (B) o koncentracích $40 \cdot 10^{-7}$ (1), $20 \cdot 10^{-7}$ (2), $10 \cdot 10^{-7}$ (3), $8 \cdot 10^{-7}$ (4), $6 \cdot 10^{-7}$ (5), měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg :120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

3.3.3 Elektrochemická detekce na GCE

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití elektrochemické detekce na GC elektrodě byly naměřeny v rozsahu koncentrací $4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro obě látky za nalezených optimálních podmínek, tedy mobilní fázi o pH 6, gradientu D a detekčním potenciálu +1,1 V.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, jsou uvedeny v Tab. 3.11 pro BP-1 a v Tab. 3.12 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9921 až 0,9986 pro BP-1 a v rozmezí 0,9918 až 0,9980 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.19. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrace obou látek je znázorněna na Obr. 3.20.

Mez detekce BP-1 byla $1,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $3,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3. Při použití GCE jako elektrochemického detektoru bylo dosaženo nižších mezí detekce, než-li při použití CPE, a to o jeden koncentrační řád.

Tab. 3.10

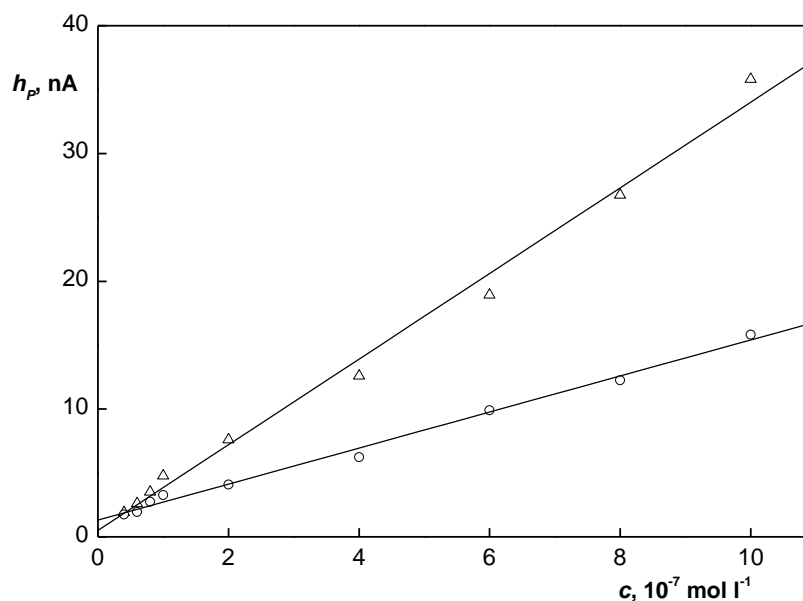
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{nA} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	207,5	141,7	0,9921	—
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	275,6	4,6	0,9986	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	335,1	0,5	0,9921	$1,3 \cdot 10^{-8}$
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-4}$	223,9	22,8	0,9962	—

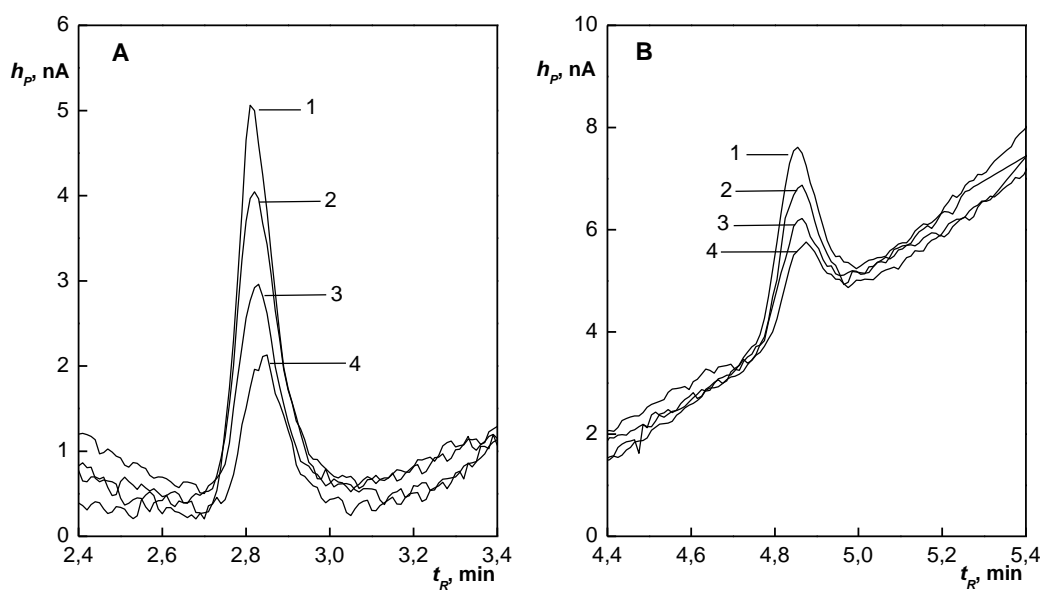
Tab. 3.11

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{nA}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek nA	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	129,3	10,6	0,9918	—
$2\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-5}$	121,2	10,2	0,9956	—
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6}$	141,0	1,3	0,9938	$3,2\cdot 10^{-8}$
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-4}$	130,3	3,3	0,9980	—

**Obr. 3.19**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro BP-1 a BP-3. Měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.20**

Výřezy chromatogramů BP-1 (A) a BP-3 (B) o koncentraci $10 \cdot 10^{-8}$ (1), $8 \cdot 10^{-8}$ (2), $6 \cdot 10^{-8}$ (3), $4 \cdot 10^{-8}$ (4) mol·l⁻¹. Měřeno metodou HPLC-ED na GCE při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

3.3.4 UV spektrofotometrická detekce

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití UV detekce byly naměřeny v rozsahu koncentrací $4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro obě látky za nalezených optimálních podmínek, tedy mobilní fázi o pH 6 a gradientu D. UV detektor byl sériově zapojený před detektor elektrochemický. UV detekce probíhala při 288 nm.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, jsou uvedeny v Tab. 3.14 pro BP-1 a v Tab. 3.15 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9964 až 0,9991 pro BP-1 a v rozmezí 0,9959 až 0,9995 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.21. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrace obou látek je znázorněna na Obr. 3.22.

Mez detekce BP-1 byla $2,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1,7 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3. Při použití UV spektrofotometrické detekce bylo dosaženo obdobných mezí detekce jako při použití elektrochemické detekce na GCE.

Tab. 3.12

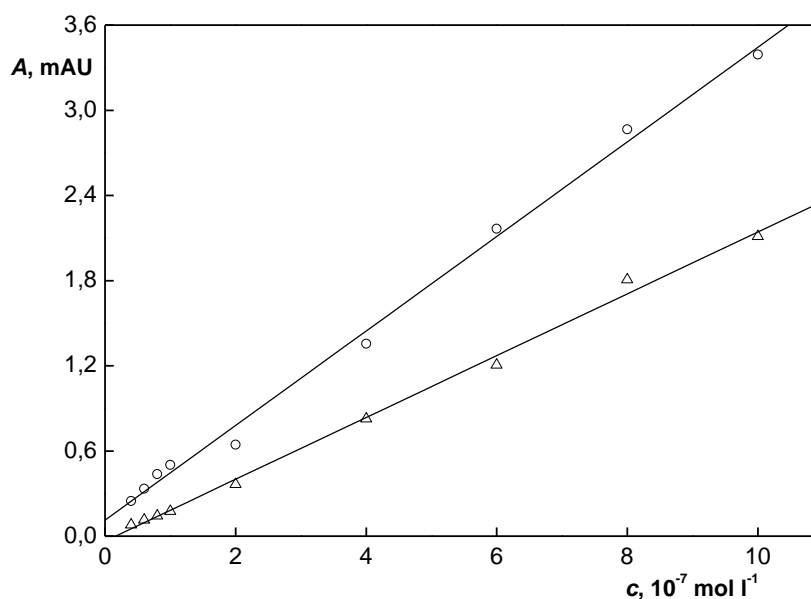
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

c $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	14,9	0,1	0,9970	—
$2 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	18,4	- 0,4	0,9991	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	21,8	-0,04	0,9964	$2,6 \cdot 10^{-8}$
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-4}$	14,9	0,7	0,9989	—

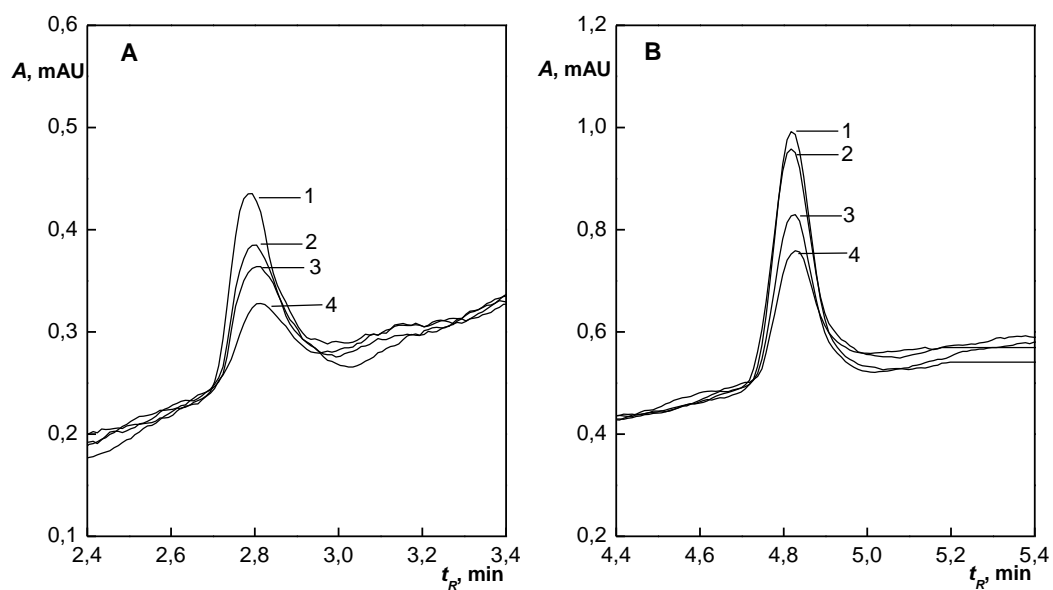
Tab. 3.13

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	16,3	3,5	0,9971	—
$2\cdot 10^{-6} - 1\cdot 10^{-5}$	19,6	0,8	0,9995	—
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6}$	33,3	0,1	0,9959	$1,7\cdot 10^{-8}$
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-4}$	16,6	1,5	0,9989	—

**Obr. 3.21**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (○) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro BP-1 a BP-3. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.22**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) a BP-3 (B) o koncentraci $10 \cdot 10^{-8}$ (1), $8 \cdot 10^{-8}$ (2), $6 \cdot 10^{-8}$ (3), $4 \cdot 10^{-8}$ (4) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.4 Stanovení studovaných látek v moči

Ke stanovení BP-1 a BP-3 v reálném vzorku moči metodou HPLC-ED na CPE byly využity nalezené optimální podmínky. K detekci byla použita CPE složená ze 120 μ l minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček. Ke stanovení v reálném vzorku moči bylo využito nejprve prekoncentrace studovaných látek metodou extrakce na tuhé fázi a dále přídavku SDS do mobilní fáze.

3.4.1 Extrakce na tuhé fázi

3.4.1.1 Optimalizace extrakce na tuhé fázi

Extrakce studovaných látek z moči byla provedena metodou extrakce na tuhé fázi na extrakčních kolonkách LiChrolut® EN 200 mg/ 3 ml (Merck, Německo) obsahujících jako sorbent kopolymer ethylvinylbenzenu a divinylbenzenu. Aktivace kolonek byla provedena dle doporučení výrobce (viz. kapitola 2.4.1) Kolonky LiChrolut® EN jsou vhodné pro stanovení v takových matricích, jakými jsou environmentální vzorky, ale i moč či plasma⁵⁰.

Jako první extrakční činidlo k vymytí adsorbovaných studovaných látek byl použit methanol, ve kterém jsou obě studované látky dobře rozpustné, a který je zároveň součástí mobilní fáze. Sledován byl výtěžek extrakce po promytí sorbentu 10 ml 100% methanolu (5 frakcí po 2 ml).

Pro optimalizaci extrakce byl výše popsáním postupem proměřen $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ roztok směsi BP-1 a BP-3 ve vodě o pH 4. Při eluci 10 ml methanolu (5 frakcí po 2 ml) bylo dosaženo výtěžnosti 98,4 % pro BP-1 a pouze 55,3 % pro BP-3. Ke zvýšení výtěžnosti BP-3 by bylo pravděpodobně nezbytné zvýšit objem elučního činidla, což bylo nežádoucí, neboť by nedošlo k zakoncentrování do co nejmenšího objemu.

Dále byl jako extrakční činidlo použit aceton (5 frakcí po 2 ml), který lze díky jeho mísitelnosti s vodou použít i pro nástřik do chromatografického systému. Extrakce byla opět prováděna z $1 \cdot 10^{-5}$ mol·l⁻¹ roztoku směsi BP-1 a BP-3 ve vodě o pH 4. Při použití acetonu jako extrakčního činidla bylo dosaženo výtěžnosti 102,3 % pro BP-1 a 87,3 % pro BP-3 (vyhodnoceno z výšek píků), přičemž největší podíl vyextrahovaných látek byl v prvních 2 frakcích (4 ml). V Tab. 3.14 jsou shrnuty výtěžnosti jednotlivých studovaných látek po použití methanolu a acetonu jako extrakčního činidla. Pro stanovení BP-1 a BP-3 v reálném vzorku moči byly tedy k vymytí studovaných látek ze sorbentu použity 4 ml acetonu.

Výtěžnosti byly znovu ověřeny během měření kalibračních závislostí v oblastech nízkých koncentrací, konkrétně pro $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, ve kterých byly měřeny reálné vzorky. Výtěžnost z roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obou analytů byla 97,5 % BP-1 a 96,6 % BP-3, z roztoku o koncentraci $5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obou analytů byla 98,0 % BP-1 a 94,8 % BP-3.

Tab. 3.14

Přehled výtěžností při použití dvou různých extrakčních činidel.

Extrakční činidlo		Methanol		Aceton	
Frakce č.	Objem	% BP-1	% BP-3	% BP-1	% BP-3
	extrakčního činidla [ml]				
1	2	2,0	0,0	96,5	76,4
2	4	60,2	0,0	5,0	9,6
3	6	32,5	3,5	0,6	1,0
4	8	3,2	24,1	0,2	0,3
5	10	0,5	27,7	0,0	0,0

3.4.1.2 Kalibrační závislosti

3.4.1.2.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 µl)

Po optimalizaci extrakčních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 v moči po jejich prekoncentraci metodou extrakce na tuhé fázi.

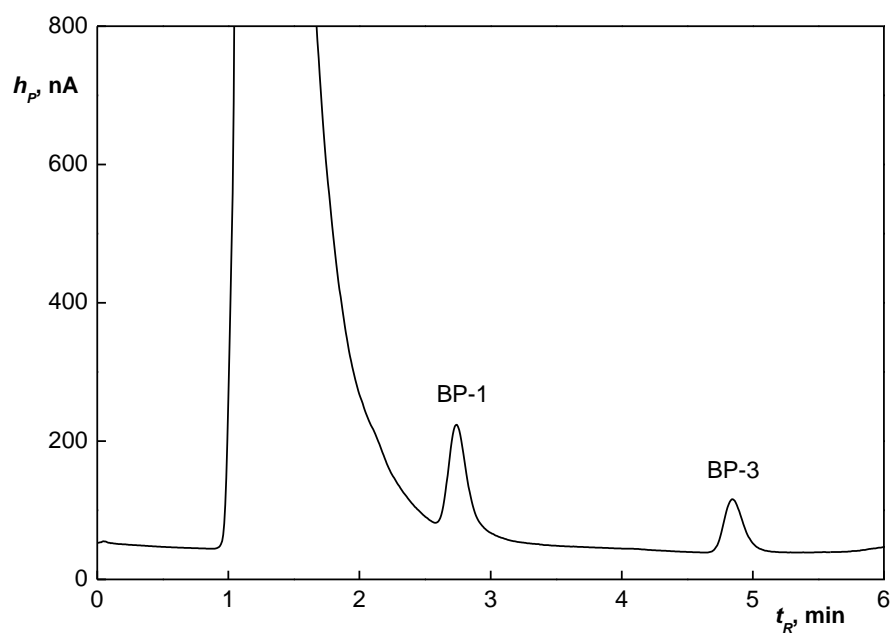
Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 v moči byly naměřeny v rozsahu koncentrací $4 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ pro obě látky za nalezených optimálních podmínek, tedy při gradientu D, mobilní fázi o pH 6 a detekčním potenciálu +1,1 V na pastě složené ze 120 µl minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček. Extrakční kolonky s adsorbovanými studovanými látkami byly promyty 4 ml acetonu.

Na Obr. 3.23 je pro ilustraci uveden chromatogram $1 \cdot 10^{-6}$ mol·l⁻¹ směsi BP-1 a BP-3 ve vzorku moči.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v Tab. 3.14 pro BP-1 a v Tab. 3.15 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích rozmezí koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.24. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrační řád pro obě látky je znázorněna na Obr. 3.25.

Mez detekce BP-1 byla $9,9 \cdot 10^{-9}$ mol·l⁻¹ a $2,1 \cdot 10^{-8}$ mol·l⁻¹ pro BP-3.

Výhodou této metody je, že dochází k zakoncentrování studovaných látek a je tak možné dosáhnout nižších mezí detekce, přičemž toto snížení dosáhlo téměř jednoho řádu.



Obr. 3.23

Chromatogram $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3 při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 3.14

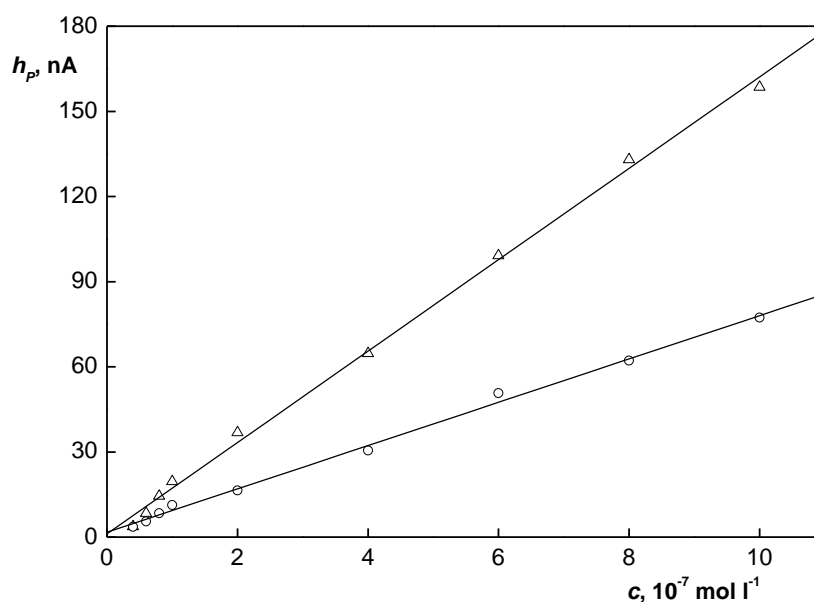
Parametry kalibračních závislostí a mez detekce BP-1 v moči při použití SPE, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

<i>c</i> mol·l ⁻¹	směrnice nA·mol ⁻¹ ·l	úsek nA	<i>R</i> ²	<i>L_D</i> mol·l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	15,6	4,9	0,9975	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$	26,9	-7,3	0,9980	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	16,1	1,1	0,9976	$9,9 \cdot 10^{-9}$

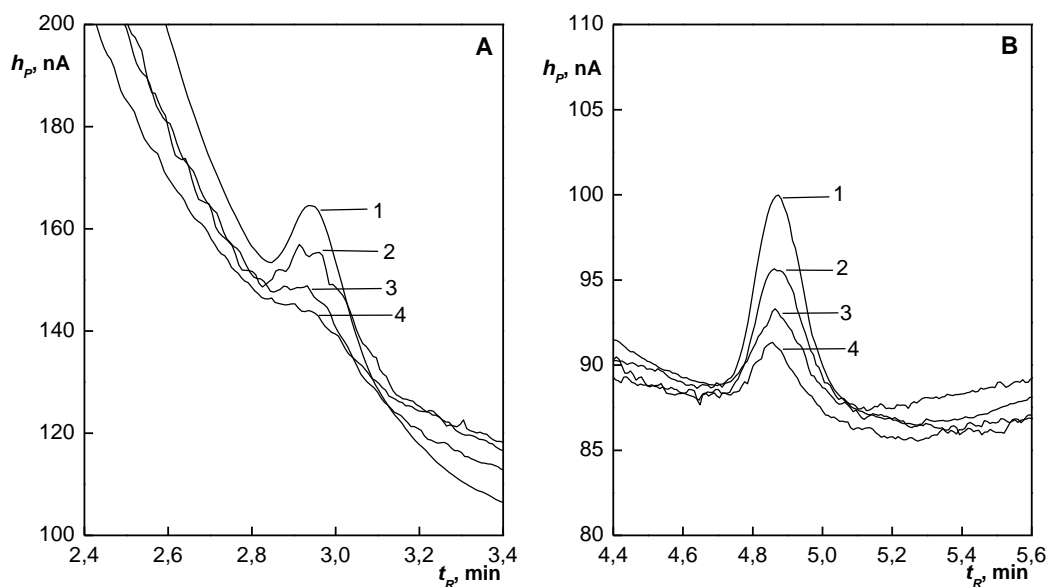
Tab. 3.15

Parametry kalibračních závislostí a mez detekce BP-3 v moči při použití SPE, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml·min⁻¹.

<i>c</i> mol·l ⁻¹	směrnice nA·mol ⁻¹ ·l	úsek nA	<i>R</i> ²	<i>L_D</i> mol·l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-6}$	7,7	1,4	0,9939	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7}$	12,9	-1,9	0,9904	—
$4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6}$	7,6	1,7	0,9966	$2,1 \cdot 10^{-8}$

**Obr. 3.24**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ pro BP-1 a BP-3 při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.25**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) a BP-3 (B) o koncentracích $10 \cdot 10^{-8}$ (1), $8 \cdot 10^{-8}$ (2), $6 \cdot 10^{-8}$ (3), $4 \cdot 10^{-8}$ (4) mol l^{-1} při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

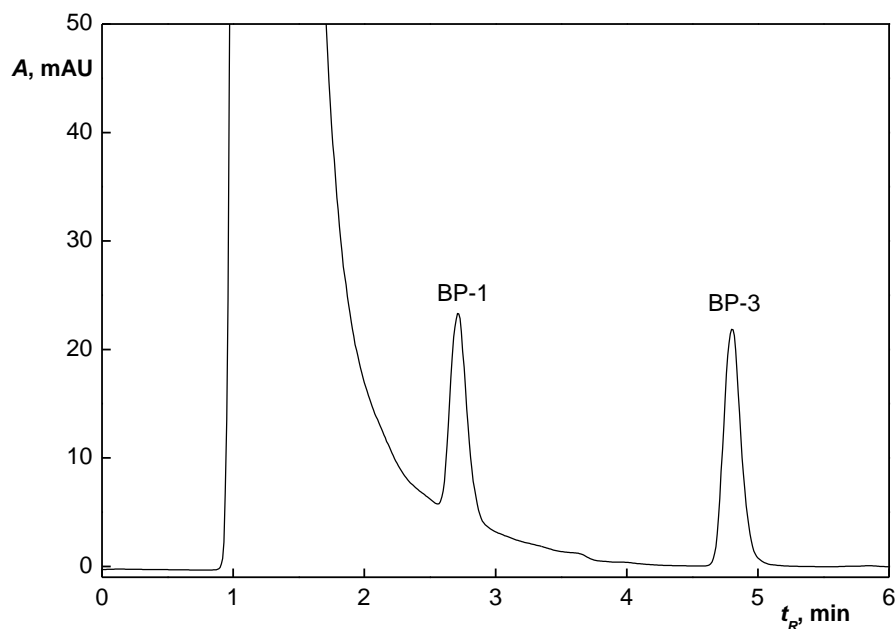
3.4.1.2.2 UV spektrofotometrická detekce

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití UV detekce byly naměřeny v rozsahu koncentrací $6 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a $4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3 za nalezených optimálních podmínek, tedy mobilní fázi o pH 6 a gradientu D. UV detekce probíhala při 288 nm. Extrakční kolony s adsorbovanými studovanými látkami byly promyty 4 ml acetonu.

Na Obr. 3.26 je pro ilustraci uveden chromatogram $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3 ve vzorku moči.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů jsou uvedeny v Tab. 3.16 pro BP-1 a v Tab. 3.17 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9989 až 1,0000 pro BP-1 a v rozmezí 0,9926 až 0,9959 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.27. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrace obou látek je znázorněna na Obr. 3.28.

Mez detekce BP-1 byla $2,0 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $1,9 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3.



Obr. 3.26

Chromatogram $1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3 při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 3.16

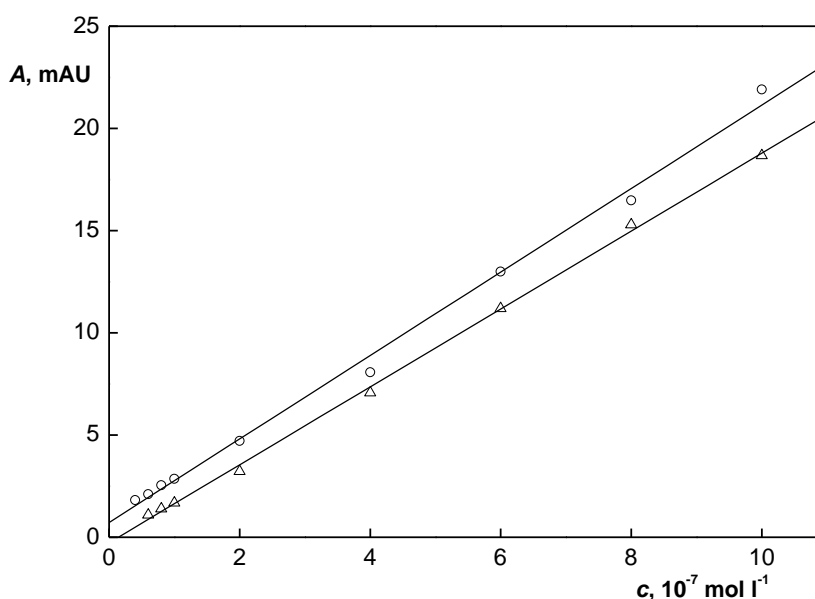
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm při použití SPE. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-6}$	2,0	-0,6	0,9989	—
$6\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-7}$	1,5	0,2	1,0000	—
$6\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6}$	1,9	-0,3	0,9989	$2,0\cdot 10^{-9}$

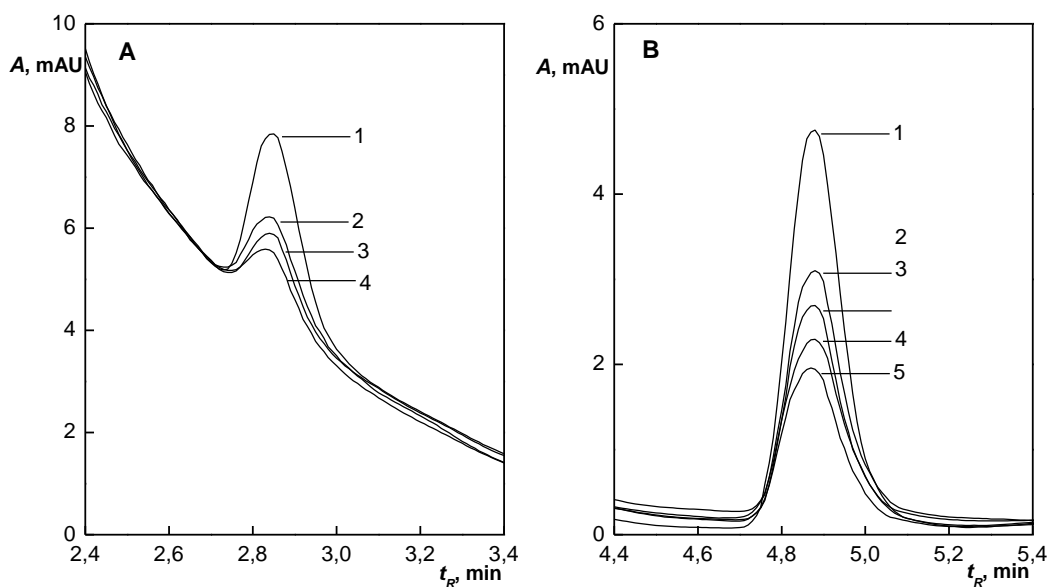
Tab. 3.17

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm při použití SPE. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-6}$	2,1	0,01	0,9939	—
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-7}$	1,8	1,1	0,9926	—
$4\cdot 10^{-8} - 1\cdot 10^{-6}$	2,0	0,7	0,9959	$1,9\cdot 10^{-9}$

**Obr. 3.27**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $6 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a $4 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3 při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.28**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) o koncentracích $20 \cdot 10^{-8}$ (1), $10 \cdot 10^{-8}$ (2), $8 \cdot 10^{-8}$ (3), $6 \cdot 10^{-8}$ (4) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a chromatogramů BP-3 (B) o koncentracích $20 \cdot 10^{-8}$ (1), $10 \cdot 10^{-8}$ (2), $8 \cdot 10^{-8}$ (3), $6 \cdot 10^{-8}$ (4), $4 \cdot 10^{-8}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ při použití SPE. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

3.4.2 Přídavek SDS do mobilní fáze

Druhým způsobem práce s reálným vzorkem moči byl přídavek SDS do methanolu, který je součástí mobilní fáze. Tento způsob přímého stanovení BP-1 a BP-3 v moči je mnohem méně časově náročný a méně pracný ve srovnání s SPE, nicméně nedochází k zakoncentrování látek a nedá se tedy očekávat snížení meze detekce. Koncentrace SDS v methanolu byla $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.4.2.1 Kalibrační závislosti

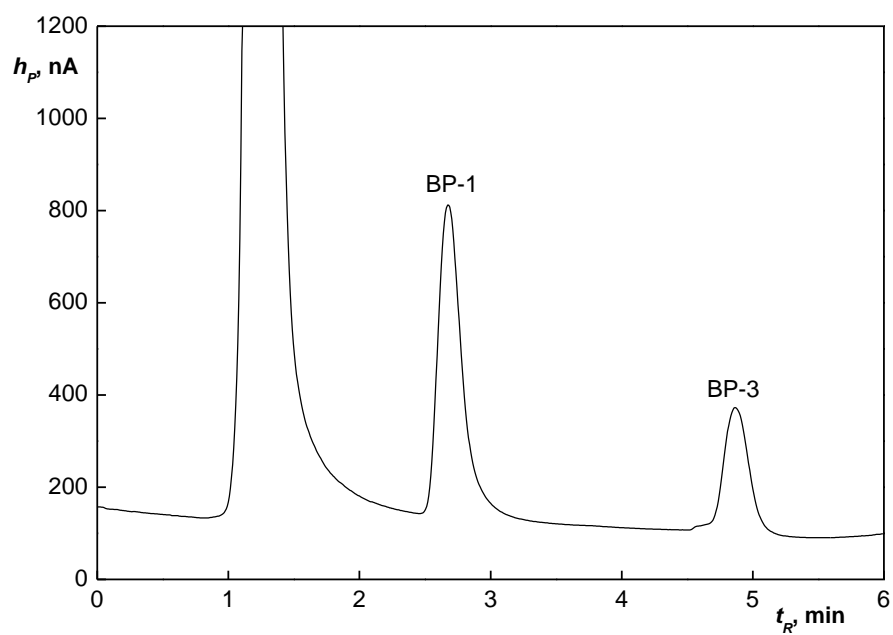
3.4.2.1.1 Elektrochemická detekce na CPE (250 mg : 120 μl)

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 v moči byly naměřeny v rozsahu koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a v rozsahu $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3 za nalezených optimálních podmínek, tedy při gradientu D, mobilní fázi o pH 6 a detekčním potenciálu +1,1 V na pastě složené ze 120 μl minerálního oleje a 250 mg uhlíkových kuliček. Koncentrace SDS v methanolu byla $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Na Obr. 3.29 je pro ilustraci uveden chromatogram $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3 ve vzorku moči.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, jsou uvedeny v Tab. 3.18 pro BP-1 a v Tab. 3.19 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9941 až 0,9982 pro BP-1 a v rozmezí 0,9938 až 0,9997 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.30. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrační řád pro obě látky je znázorněna na Obr. 3.31.

Mez detekce BP-1 byla $1,5 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $2,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3.



Obr. 3.29

Chromatogram $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, pH mobilní fáze 6, průtoková rychlost mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 3.18

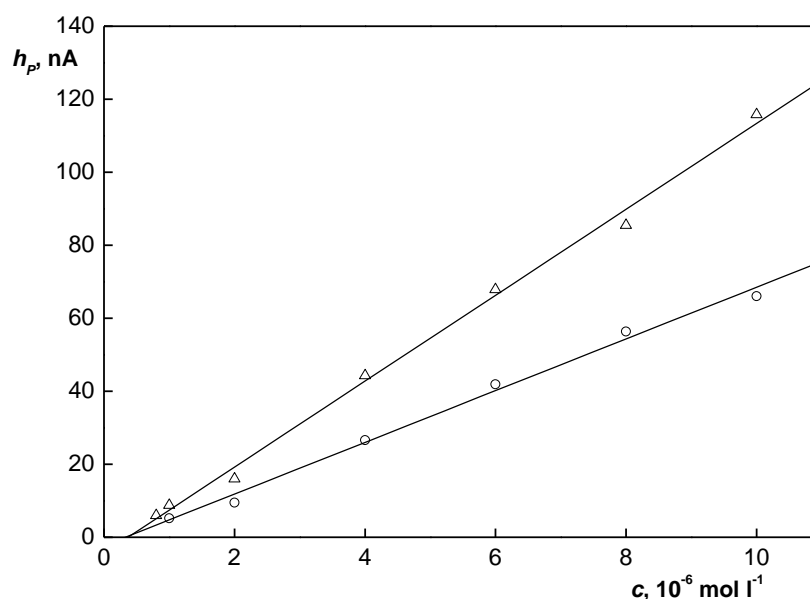
Parametry kalibračních závislostí a mez detekce BP-1 v moči, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml \cdot min⁻¹.

c mol \cdot l ⁻¹	směrnice nA \cdot mol ⁻¹ \cdot l	úsek nA	R^2	L_D mol \cdot l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	62,9	59,3	0,9982	—
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$	117,7	-4,3	0,9961	$1,5 \cdot 10^{-7}$
$8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4}$	68,1	22,5	0,9941	—

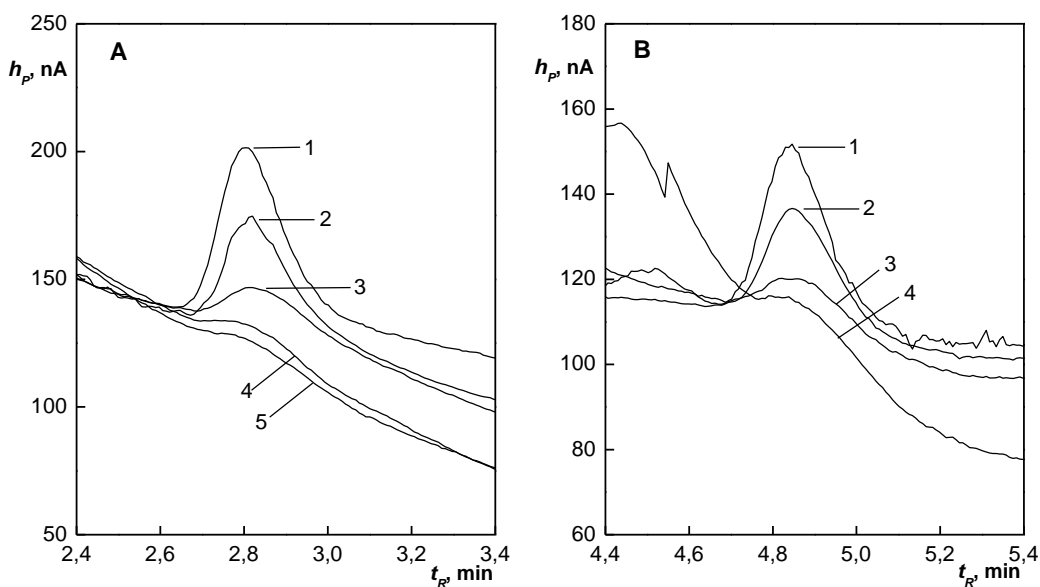
Tab. 3.19

Parametry kalibračních závislostí a mez detekce BP-3 v moči, měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μ l) při potenciálu +1,1 V. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μ m, C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μ l směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 ml \cdot min⁻¹.

c mol \cdot l ⁻¹	směrnice nA \cdot mol ⁻¹ \cdot l	úsek nA	R^2	L_D mol \cdot l ⁻¹
$2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$	36,0	31,5	0,9997	—
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5}$	70,8	-2,3	0,9938	$2,6 \cdot 10^{-7}$
$1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	38,1	16,5	0,9949	—

**Obr. 3.30**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-1 a $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.31**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) o koncentracích $60 \cdot 10^{-7}$ (1), $40 \cdot 10^{-7}$ (2), $20 \cdot 10^{-7}$ (3), $10 \cdot 10^{-7}$ (4), $8 \cdot 10^{-7}$ (5) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a chromatogramů BP-3 (B) o koncentracích $60 \cdot 10^{-7}$ (1), $40 \cdot 10^{-7}$ (2), $20 \cdot 10^{-7}$ (3), $10 \cdot 10^{-7}$ (4) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 120 μl) při potenciálu +1,1 V. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

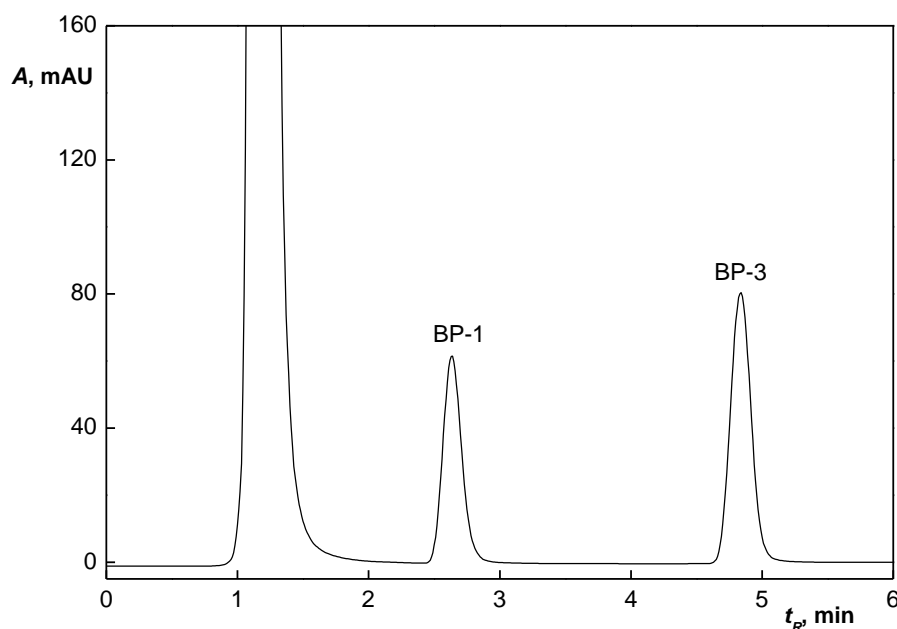
3.4.2.1.2 UV spektrofotometrická detekce

Kalibrační závislosti BP-1 a BP-3 za použití UV detekce byly naměřeny v rozsahu koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro obě látky za nalezených optimálních podmínek, tedy mobilní fázi o pH 6 a gradientu D. UV detekce probíhala při 288 nm. Extrakční kolonky s adsorbovanými studovanými látkami byly promyty 4 ml acetonu.

Na Obr. 3.32 je pro ilustraci uveden chromatogram $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3 ve vzorku moči.

Parametry jednotlivých kalibračních křivek, získané vyhodnocením příslušných výšek píků z naměřených chromatogramů, jsou uvedeny v Tab. 3.20 pro BP-1 a v Tab. 3.21 pro BP-3. Kalibrační závislosti jsou lineární v celém rozsahu měření, korelační koeficienty se pohybují v rozmezí 0,9883 až 0,9979 pro BP-1 a v rozmezí 0,9896 až 0,9969 pro BP-3. Závislosti výšky píků (h_p) na koncentraci studovaných látek v nejnižších rozmezích koncentrací jsou znázorněny na Obr. 3.33. Série chromatogramů pro nejnižší koncentrace obou látek je znázorněna na Obr. 3.34.

Mez detekce BP-1 byla $7,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $4,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro BP-3.



Obr. 3.32

Chromatogram $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ směsi BP-1 a BP-3. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtoková rychlost mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

Tab. 3.20

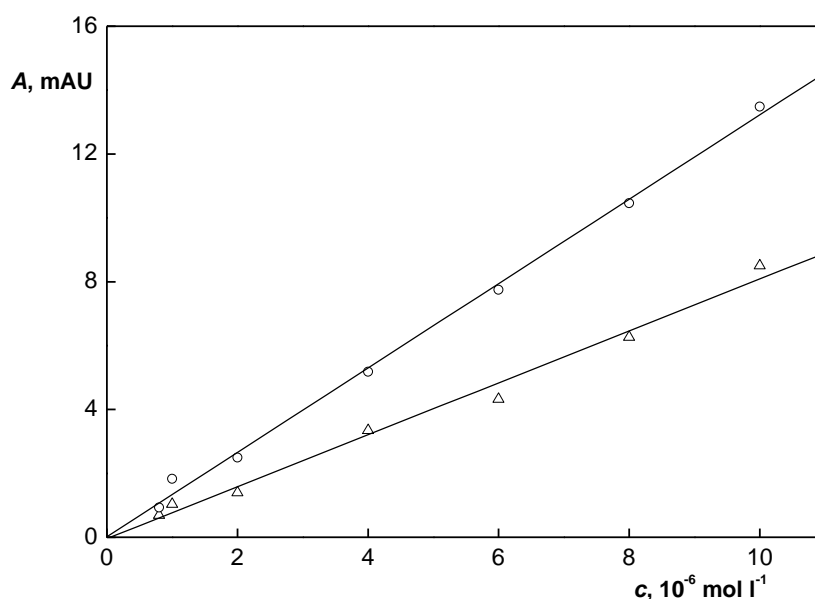
Parametry kalibračních závislostí BP-1, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	5,8	4,7	0,9979	—
$8\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-5}$	8,1	-0,04	0,9883	$7,0\cdot 10^{-8}$
$8\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	6,3	1,5	0,9964	—

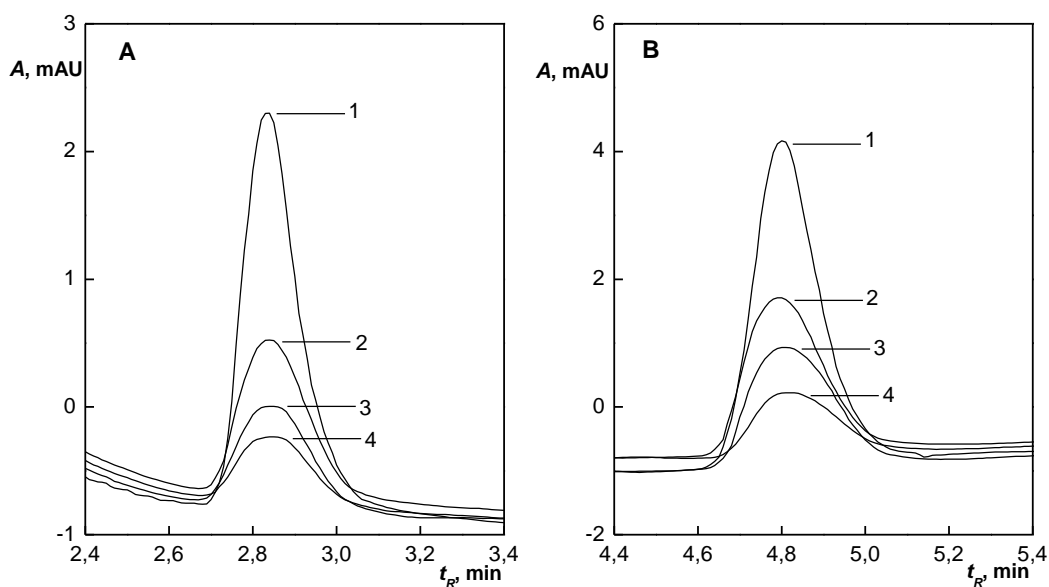
Tab. 3.21

Parametry kalibračních závislostí BP-3, měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Vyhodnoceno z výšek píků. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

c $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$	směrnice $\text{mAU}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$	úsek mAU	R^2	L_D $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
$2\cdot 10^{-5} - 1\cdot 10^{-4}$	7,1	11,2	0,9963	—
$8\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-5}$	13,2	0,01	0,9969	$4,3\cdot 10^{-8}$
$8\cdot 10^{-7} - 1\cdot 10^{-4}$	8,1	3,5	0,9896	—

**Obr. 3.33**

Kalibrační křivky BP-1 (Δ) a BP-3 (\circ) vyhodnocené z výšek píků v rozmezí koncentrací $8 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}$ pro obě látky. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

**Obr. 3.34**

Výřez chromatogramů BP-1 (A) a BP-3 (B) o koncentracích $40 \cdot 10^{-7}$ (1), $20 \cdot 10^{-7}$ (2), $10 \cdot 10^{-7}$ (3) a $8 \cdot 10^{-7}$ (4) $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Měřeno metodou HPLC-UV při vlnové délce 288 nm. Kolona Kromasil 100-7 μm , C18, 150 x 4,6 mm, dávkováno 20 μl směsi, gradient D, mobilní fáze o pH 6, průtok mobilní fáze 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

4. Závěr

Byla ověřena stálost zásobních roztoků 2,4-dihydroxybenzofenonu a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ v methanolu.

Bylo prostudováno chování 2,4-dihydroxybenzofenonu a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu metodou HPLC s elektrochemickou detekcí na uhlíkových pastových elektrodách různého složení a GC elektrodě a s UV spektrofotometrickou detekcí.

Byly nalezeny optimální podmínky stanovení směsi studovaných látek: mobilní fáze o pH 6, gradient D, tj. v 0 minutách byl obsah methanolu 70 %, v 5 minutách byl obsah methanolu 91 %, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu byl +1,1 V (pro CPE i GCE).

UV spektrofotometrická detekce probíhala při 288 nm.

Za nalezených optimálních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti a vypočítány z nich meze detekce 2,4-dihydroxybenzofenonu a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenonu (Tab. 4.1). Je zřejmé, že meze detekce s elektrochemickou detekcí na uhlíkových pastách různého složení jsou obdobné. Nižších mezí detekce bylo dosaženo při použití GC elektrody či při spojení HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí.

K předúpravě vzorku moči bylo využito metody extrakce na tuhé fázi, která byla nejprve optimalizována. Druhým způsobem práce s reálným vzorkem moči byl přídavek SDS do methanolu, který byl součástí mobilní fáze. Studované látky byly stanoveny ve vzorku moči metodou HPLC s elektrochemickou detekcí za použití uhlíkové pastové elektrody složené z 250 mg uhlíkových kuliček a 120 μl minerálního oleje a pomocí UV spektrofotometrické detekce při 288 nm. Stanovení probíhala za nalezených optimálních podmínek. Získané meze detekce ve vzorku moči jsou uvedeny v Tab. 4.2.

Tab. 4.1

Přehled mezí detekce BP-1 a BP-3 získaných metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 μl), CPE (250 mg : 120 μl) a na GCE a metodou HPLC-UV.

Meze detekce [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]				
Analyt	Druh detekce			
	CPE (250 mg : 90 μl)	CPE (250 mg : 120 μl)	GCE	UV
BP-1	$1,6 \cdot 10^{-7}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$	$1,3 \cdot 10^{-8}$	$2,6 \cdot 10^{-8}$
BP-3	$3,3 \cdot 10^{-7}$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$3,2 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^{-8}$

Tab. 4.2

Přehled získaných mezí detekce BP-1 a BP-3 ve vzorku moči získaných metodou HPLC-ED na CPE (250 mg : 90 µl), CPE (250 mg : 120 µl) a na GCE a metodou HPLC-UV.

Meze detekce [mol·l ⁻¹]				
Analyt	SPE		SDS	
	CPE (250 mg : 120 µl)	UV	CPE (250 mg : 120 µl)	UV
BP-1	$9,9 \cdot 10^{-9}$	$2,0 \cdot 10^{-9}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$	$7,0 \cdot 10^{-8}$
BP-3	$2,1 \cdot 10^{-8}$	$1,9 \cdot 10^{-9}$	$2,6 \cdot 10^{-7}$	$4,3 \cdot 10^{-8}$

5. Použitá literatura

- 1 Vela-Soria, F.; Jiménez-Díaz, I.; Rodríguez-Gómez, R.; Zafra-Gómez, A.; Ballesteros, O.; Navalen, A.; Vilchez, J.L.; Fernández, M.F.; Olea, N.: Determination of benzophenones in human placenta tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **85**, 1848 – 1855 (2011).
- 2 Zhang, Y.; Kee Lee, H.: Determination of ultraviolet filters in water samples by vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1249**, 25 – 31 (2012).
- 3 Kunisue, T.; Wu, Q.; Tanabe, S.; Aldous, K.M.; Kajman, K.: Analysis of five benzophenone-type UV filters in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **2**, 707 – 713 (2010).
- 4 Wu, Y.-W.; Jiang, Y.-Y.; Liu, J.-F.; Xiong, K.: Cloud point extraction combined with micellar electrokinetic capillary chromatography determination of benzophenones in cosmetic matrix. *Electrophoresis* **29**, 819 – 826 (2008).
- 5 Miletín, M.: Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. *Praktické lékařství* **7**, 34 – 38 (2011).
- 6 Zhang, Z.; Ren, N.; Li, Y.F.; Kunisue, T.; Gao, D.; Kajman, K.: Determination of Benzotriazole and Benzophenone UV Filters in Sediment and Sewage Sludge. *Environmental Science & Technology* **45**, 3909 – 3916 (2011).
- 7 Liu, T.; Wu, D.: Simultaneous determination of some ultraviolet-absorbing chemicals in sunscreen cosmetics using a high-performance liquid chromatography method. *International Journal of Cosmetic Science* **33**, 408 – 415 (2011).
- 8 Okanouchi, N.; Honda, H.; Ito, R.; Kawaguchi, M.; Saito, K.; Nakazawa H.: Determination of Benzophenones in River-water Samples Using Drop-Based Liquid phase Microextraction Coupled with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* **24**, 627 – 630 (2008).

- 9 Kawaguchci, M.; Ito, R.; Honda, H.; Endo, N.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H.: Measurement of Benzophenones in Human Urine samples by Stir Bar Sorptive extraction and Thermal Desorption-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* **24**, 1509 – 1512 (2008).
- 10 Wang, L.-H.: Simultaneous Determination of seven Sunscreen Benzophenones in Cosmetic Products by High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **50**, 565 – 570 (1999).
- 11 He, Y.-Y.; Zhang, B.-X.; Jia, F.-L.: Protective effects of 2,4-dihydroxybenzophenone against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *World Journal of Gastroenterology* **17(21)**, 2663 – 2666 (2011).
- 12 Kerdivel, G.; Le Guevel, R.; Habauzit, D.; Brion, F.; Ait- Aissa, S.; Pakdel, F.: Estrogenic Potency of Benzophenone UV Filtres in Brest Cancor Cells: Proliferative and Transcriptional Activity Substantiated by Docking Analysis. *Plos One* **8**, 1 – 13 (2013).
- 13 Negreira, N.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R.: Solid.phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spektrometry for the determination of hydroxylted benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta* **654**, 162 – 170 (2009).
- 14 Kunisue, T.; Chen, Z.; Louis, G.M.B.; Sundaram, R.; Hediger. M.L.; Sun, L.; Kajman, K.: Urinary Concentrations of Benzophenone-type UV filtres in U.S. Women and Their Association with Endometriosis. *Environmental Science & Technology* **46**, 4624 – 4632 (2012).
- 15 Ducháček, V.: Polymery- výroba, vlastnosti, zpracování, použití. 2. vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Praha 2006.
- 16 Stojić, N.; Erik, S.; Kuzmanovski, I.: Prediction of toxicity and data exploratory analysis of estrogen-active endocrine disruptors usány counter-propagation artificial neural network. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **29**, 450 – 460 (2010).
- 17 Hrubá, D.: Endokrinní disruptory. Hygiena, Praha: Státní zdravotní ústav **54**, 23 – 26 (2009).

- 18 Yang, H.Y.; Li, H.F.; Ito, M.; Lin, J.-M.; Guo, G.S.; Ding, M.Y.: Combination of dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction with HPLC analysis for the determination of UV filters in cosmetic products. *Science China Chemistry* **54**, 1627 – 1634 (2011).
- 19 Ye, X.; Kuklenyik, Z.; Needham, L.L.; Calafat, A.M.: Automated On-Line Column-Switching HPLC-MS/MS Method with Peak Focusing for the Determination of Nine Environmental Phenols in Urine. *Analytical Chemistry* **77**, 5407 – 5413 (2005).
- 20 Ye, X.; Kuklenyik, Z.; Needham, L.L.; Calafat, A.M.: Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**, 638 – 644 (2005).
- 21 Vidal, L.; Chisvert, A.; Canals, A.; Salvador, A.: Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A* **1174**, 95 – 103 (2007).
- 22 Kawaguchi, M.; Ito, R.; Honda, H.; Koganei, Y.; Okanouchi, N.; Saito, K.; Seto, Y.; Nakazawa, H.: Miniaturized hollow fiber-assisted liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determination of benzophenone and derivatives in human urine sample. *Journal of Chromatography B* **877**, 298 – 302 (2009).
- 23 Ito, R.; Kawaguchi, M.; Koganei, Y.; Honda, H.; Okanouchi, N.; Sakui, N.; Saito, K.; Nakazawa, H.: Development of Miniaturized Hollow-fiber Assisted Liquid-phase Microextraction with in situ Acyl Derivatization Followed by GC-MS for the Determination of Benzophenones in Human Urine Samples. *Analytical Sciences* **25**, 1033 – 1037 (2009).
- 24 Ye, X.; Bishop, A.M.; Needham, L.L.; Calafat, A.M.: Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta* **622**, 150 – 156 (2008).

- 25 Ye, X.; Tao, L.J.; Needham, L.L.; Calafat, A.M.: Automated on-line column switching HPLC-MS/MS method for measuring environmental phenols and parabens in serum. *Talanta* **76**, 865 – 871 (2008).
- 26 Janjua, N.R.; Kongshoj, B.; Anderson, A.M.; Wulf, H.C.: Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **22**, 456 – 461 (2008).
- 27 Adams, R.N.: Carbon Paste Electrodes. *Analytical Chemistry* **30**, 1576 – 1576 (1958).
- 28 Švancara, I.; Vytřas, K.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Wang, J.: Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis. *Electroanalysis* **21**, 7 – 28 (2009).
- 29 Švancara, I.; Walcarius, A.; Kalcher, K.; Vytřas, K.: Carbon paste electrodes in the new millenium. *Central European Journal of Chemistry* **7**, 598 – 656 (2009).
- 30 Švancara, I.; Vytřas, K.: Příprava a vlastnosti uhlíkových pastových elektrod. *Chemické Listy* **88**, 138 – 146 (1994).
- 31 Švancara, I.; Schachl, K.: Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemické Listy* **93**, 490 – 499 (1999).
- 32 Švancara, I.; Vytřas, K.; Barek, J.; Zima, J.: Carbon Paste Electrodes in Modern Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **31**, 311 – 342 (2001).
- 33 Švancara, I.; Ogorevc, B.; Hočevár, S.B.; Vytřas, K.: Perspectives of Carbon Paste Electrodes in Stripping Potentiometry. *Analytical Sciences* **18**, 301 – 305 (2002).
- 34 Zima, J.; Švancara, I.; Barek, J.; Vytřas, K.: Recent Advances in Electroanalysis of Organic Compounds at Carbon paste electrodes. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **39**, 204 – 227 (2009).
- 35 Vytřas, K.; Švancara, I.: Aplikace uhlíkových pastových elektrod v elektroanalýze. *Chemické Listy* **88**, 412 – 422 (1994).

- 36 Zima, J.: Využití uhlíkových pastových elektrod v analýze léčiv a toxických látek, v knize: *Klinická a toxikologická analýza* (Štulík, K., Zima, T., ed.), kap. 18, str. 124 – 130, Praha 2008 (ISBN: 978 – 80 – 86238 – 51 – 7).
- 37 *ChromBook 06/07, Chromatography at Merck – Experience drives Innovation*, p. 24 – 25, Merck, Darmstadt (2006).
- 38 Jemelková, Z.; Zima, J.; Barek, J.: Electroanalysis of some catecholamines at single-wall nanotubes modified carbon paste electrode. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **75**, 1217 – 1228 (2010).
- 39 Elschiak, M. A.; Carlson, J.H.: Assay of free and conjugated catecholamines by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* **233**, 79 – 88 (1982).